
UNIVERSITÉ
DE LORRAINE




FACULTE DES SCIENCES & TECHNOLOGIES

Thèse cofinancée par la région Lorraine et le projet ANR Vulnoz
Collegium Sciences & Technologies
UMR1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières
Ecole Doctorale RP2E
Département de Formation Doctorale Sciences agronomiques et forestières, biologie et écologie, biotechnologies

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

en biologie végétale et forestière

par **Jennifer DUMONT**

Rôle de la régulation stomatique et de la capacité de détoxication foliaire dans l'estimation d'un seuil de risque à l'ozone pour la végétation

Soutenance publique le 19 avril 2013

Membres du jury :

Président :	M. Yves JOLIVET	Professeur, Université de Lorraine, Nancy
Rapporteurs :	M. Daniel LAFFRAY	Professeur, Université Paris Est Créteil, Paris
	Mme Nathalie LEONHARDT	Chargée de Recherche, CEA, Cadarache
Examinateurs :	M Pierre DIZENGREMEL	Professeur émérite, Université de Lorraine, Nancy
	M Markku KEINÄNEN	Senior assistant, University of Eastern Finland, Joensuu
	M. Didier LE THIEC	Directeur de Recherche, INRA, Nancy (Directeur de thèse)
	Mrs. Elina OKSANEN	Professor, University of Eastern Finland, Joensuu

---

UMR1137 INRA/UL Ecologie et Ecophysiologie Forestières
Faculté des Sciences & Technologies - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

A mes parents qui m'ont toujours soutenue et aimée ;
c'est grâce à vous que je suis arrivée jusque là, soyez fiers de vous !

A Fabien, sans qui cette thèse ne serait pas la même,
merci pour tout ce que tu m'apportes chaque jour.

A mon oncle et parrain qui m'a appris que la vie vaut le coup,
qu'il ne faut jamais abandonner, qu'il faut se battre
pour le bonheur qui nous entoure,
pour la vie tout simplement.
Regarde moi, je suis heureuse

Dans la vie, tout n'est qu'une question de volonté.

REMERCIEMENTS

Je remercie l'ANR Vulnoz et la Région Lorraine pour avoir cofinancé cette thèse, ainsi que, l'INRA, l'IFR 110 EFABA, le COST Action FP0903, the University of Eastern Finland, la plate-forme Métabolome-Fluxome de Bordeaux et le LABEX Arbre pour leur soutien financier et matériel.

Mes remerciements s'adressent d'abord à toi, Didier Le Thiec, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse. Tout au long de ces 3 ans (et demi), tu m'as toujours guidée efficacement. Toujours à l'écoute, nous avons pu construire ensemble cette étude grâce à tes conseils et à ta réactivité. Tu m'auras permis de voyager pour exposer mes résultats, d'acquérir des compétences variées, et ce jusqu'au pays du père Noël, que demander de plus ?!

Un grand merci à Pierre Dizengremel qui aura été là pour me présenter avec passion la problématique de l'ozone lors de mes premiers pas à Nancy et qui a accepté de participer à mon jury de thèse pour voir l'aboutissement de cette belle histoire qu'il aura suivi tout du long.

Yves Jolivet, tu m'as soutenue toujours avec calme et sérieux, tu as accepté d'être mon président de jury et surtout mon tuteur de monitorat. Grâce à toi j'ai pu enseigner comme je le souhaitais, merci, ça représentait beaucoup pour moi.

Marie-Noëlle Vaultier, merci d'avoir relu mon manuscrit et d'avoir toujours accepté de mettre la main à la pâte pour m'aider. Garde la bonne humeur qui te caractérise si bien.

Je remercie vivement Nathalie Leonhardt et Daniel Laffray pour avoir accepté de juger mon manuscrit de thèse en tant que rapporteurs.

Elina Oksanen et Markku Keinänen, je vous suis très reconnaissante d'avoir fait le déplacement à Nancy pour faire partie de mon jury de thèse. Merci à vous deux, mais aussi à Sari, Sarita, Inna, Jenna, Maarit, sans oublié Matti, pour m'avoir tellement bien accueillie et m'avoir tant aidée. Je garderai toujours en mémoire ces trois mois passés avec vous tous en Finlande.

Je remercie aussi Yves Gibon qui m'aura accueillie dans son équipe à Bordeaux et Pierre Baldet qui m'aura aidée à venir à bout de l'ascorbate et du glutathion.

Je crois qu'il convient ensuite de remercier comme il se doit ceux qui ont du me supporter durant quelques mois ou quelques années dans leur bureau, me connaissant ça n'a pas du être facile tous les jours pour eux ! Rémy, Silvère, Inna et le « petit » dernier François. Tous à votre façon vous m'avez aidée au quotidien.

Et puis, il y a aussi ceux qui ont du me supporter dans leur bureau malgré que ce ne soit pas le mien, tout particulièrement David et Cyril! David, tu auras été d'un grand soutien pour moi, tant au niveau technique que moral. Merci d'avoir été toujours disponible pour moi, de m'avoir conseillée et écoutée. Sans toi, ça n'aurait décidément pas été pareil, tu resteras toujours mon maître Jedi. Cyril merci d'avoir accepté mes entrées intempestives et surement trop fréquentes dans ton bureau ^^ Je n'oublie pas non plus ton aide technique et ton efficacité.

NathNath, je n'aurai pas compté les mots et tu es après David, mais comme tu m'auras toujours aidée de bon cœur et qu'avec toi mes journées auront été bien plus joyeuses grâce à ta spontanéité, ta bonne humeur et ton rire communicatif (surtout quand tu as bu), je te remercie beaucoup.

Irène, je te dois une spéciale dédicace car sans toi et ton esprit de générosité, il n'y aurait pas eu de manuscrit ! En tout cas, toujours directe, tu n'en restes pas moins quelqu'un d'essentiel pour l'équipe car tu es avant tout quelqu'un d'humain, toujours là pour veiller sur les autres.

J'ai pu découvrir le monde de la microscopie en autre grâce à vous Lu et Joëlle. Vous m'aurez appris toujours avec patience. Vous aurez été mes guides vers l'infiniment petit !

J'ai aussi pu faire mes premiers dans l'univers de R et des statistiques. Pierre merci de m'avoir fait profiter de tes connaissances et de tes conseils, à tes côtés on en apprend toujours.

Franck tu auras été mon sauveur, tu auras su préserver mes données, et ce, malgré mon karma quelque peut capricieux, ce n'était pas gagné, alors merci et félicitations.

Je n'oublierai certes pas Cyndie, un petit rayon de soleil. Ca fait du bien en Lorraine mais malheureusement ça dure jamais assez longtemps, ce fut un plaisir de travailler avec toi.

Stéphane, merci pour ton aide dans la gestion des chambres phytotroniques. Désolée de t'avoir autant embêté, soir et week-end compris. Ce n'était pas toujours facile, mais on aura réussi.

Aurélie, tu auras été une stagiaire telle que l'on espère toujours en avoir. Ton encadrement aura toujours été facile et agréable.

En complément de mes recherches j'ai pu transmettre un peu de mes connaissances (enfin j'espère !) par l'intermédiaire de l'enseignement. Ceci n'aurait pas été possible sans Jean-Claude, Dany, Valérie, Pierrick et bien sûr Yves. Grâce à vous, l'expérience aura été une réussite.

*Enfin j'ai une pensée particulière pour les autres doctorants ayant déjà soutenu, en particulier Ata mon « binôme » de fumigation, mais aussi Nicolas, Rana, Rémy, Pauline, Cyril, Sacha, Fahad, Clément, Nianguiri, Daniel, ou en train de s'en rapprocher. Julien, Silvère et Florian courage c'est la dernière ligne droite. Emilie j'espère que tu as trouvé ta voie. Morgane, même si tu manques d'assurance parfois, tu iras loin si tu gardes confiance en toi. Tu es capable de tout si tu le veux vraiment. François et Charlotte vous avez encore un peu de temps profitez en bien, ça passe vite, et longue vie à la journée des doctorants ^^*

Nicolas, sans avoir travaillé directement avec toi, tu m'auras marquée par ta gentillesse. Je me souviendrai toujours de toi qui avais toujours un mot agréable accompagné d'un sourire.

Pour finir, je remercie tous ceux qui m'ont apporté de la bonne humeur au quotidien. En premier lieu Christian sans qui la pause café serait moins agréable mais aussi Marie-Béatrice, Oliver, Patrick, Béatrice, Audrey, André, Jacqueline, Nicolas, Agnès, Dominique, Adeline, Pascal, Pascale, Erwin, Rosine, Sandrine, Mireille, Lysiane, Laurence, Marie-Paule, Damien, Bernard, Caroline, François, Jean-Marie, Daniel, Bernard, Stéphane, Patrick, Claude, Raphaël, Damien, Nathalie, Carole, Dorine…

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX



FIGURES

TABLEAUX

SOMMAIRE

SOMMAIRE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

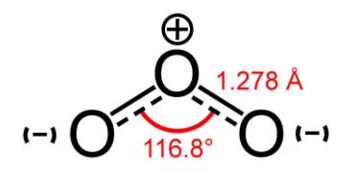


Figure 1 : Structure de la molécule d'ozone

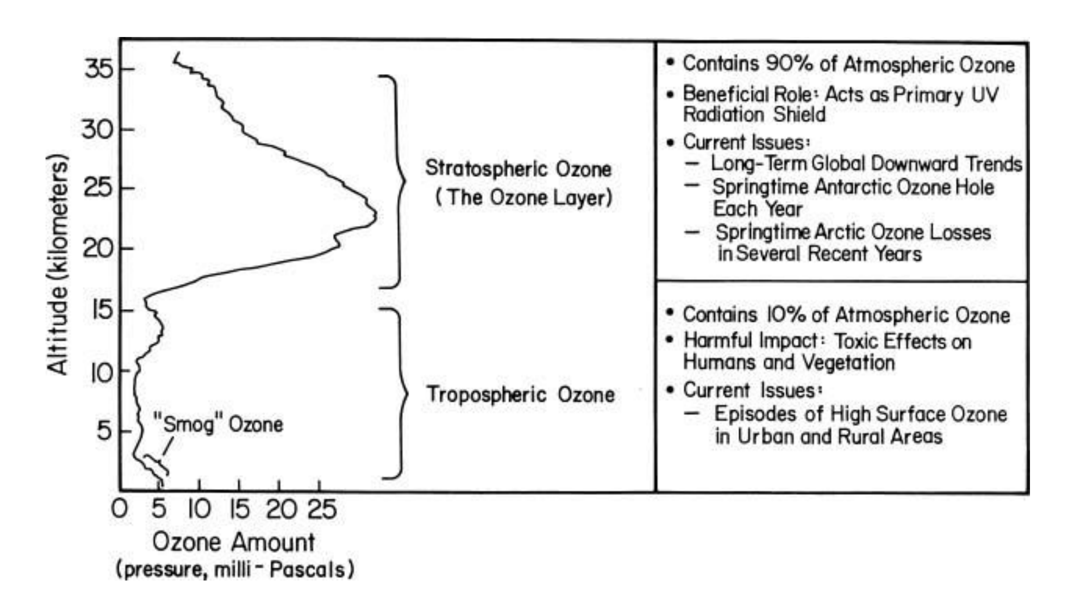


Figure 2 : Répartition de l'ozone atmosphérique selon l'altitude. (Document émis par la NASA)

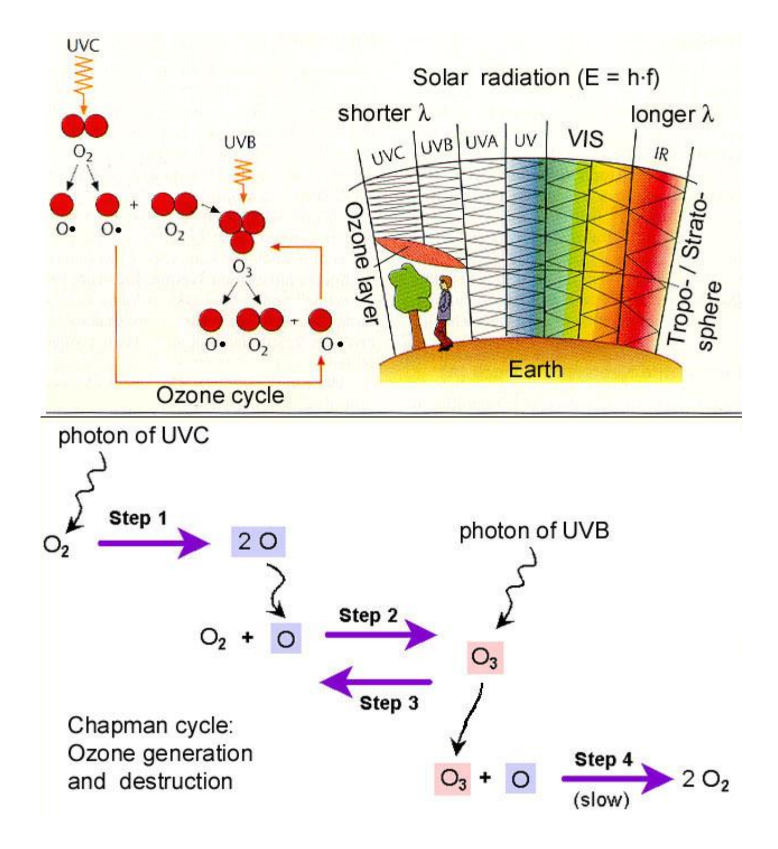


Figure 3 : Cycle de génération-destruction de l'ozone ou cycle de Chapman (Yip, 2000)

I. OZONE

1. GENERALITES SUR L'OZONE

La molécule d'ozone (O_3) est une variété allotropique de l'oxygène, composée de trois atomes, présente naturellement dans l'atmosphère (Figure 1). La découverte de l'ozone est attribuée au chimiste suisse Christian Friedrich Schönbein, qui lui donne le nom d'ozone en 1840 en se basant sur le mot grec *ozein* signifiant « exhaler une odeur ». Cependant, l'odeur âcre caractéristique de l'ozone avait déjà été mise en évidence par le chimiste Hollandais Martin Van Marum en 1789. Contenu à 90% dans la stratosphère (entre 15 et 35 km d'altitude), constituant la couche d'ozone, l'ozone protège la vie terrestre des irradiations aux Ultra-violets provenant du soleil, tandis que les 10% d'ozone compris dans la troposphère (entre 0 et 15 km d'altitude) représentent une menace pour la vie terrestre (Figure 2). En effet, c'est un puissant polluant, gaz à effet de serre, nocif pour la santé, qui agit comme une phytotoxine. Sa toxicité pour la végétation se traduit surtout par un stress oxydatif.

2. CYCLE DE L'OZONE

L'ozone stratosphérique constituant la couche d'ozone est produit et dégradé naturellement par le cycle de formation-destruction ou cycle de Chapman (Figure 3), ce qui dans une atmosphère non polluée, lui confère une concentration stable. Ce cycle se base sur la succession de plusieurs réactions commençant par la photolyse de molécules d'oxygène sous l'action des UV (1) (longueurs d'onde inférieures à 242 nm). Les atomes d'oxygène produits réagissent rapidement avec le dioxygène pour former une molécule d'ozone (2). L'ozone peut alors lui-même être rapidement photolysé (3), entraînant un équilibre entre les réactions (2) et (3). L'ozone peut aussi être détruit par une réaction lente en réagissant avec un atome d'oxygène (4).

(1) $O_2 + h\nu \rightarrow O + O$

(2) $O + O_2 + M \rightarrow O_3 + M$

où M est un partenaire de collision non affecté par la réaction

(3) $O_3 + h\nu \rightarrow O + O_2$

(4) $O + O_3 \rightarrow 2O_2$

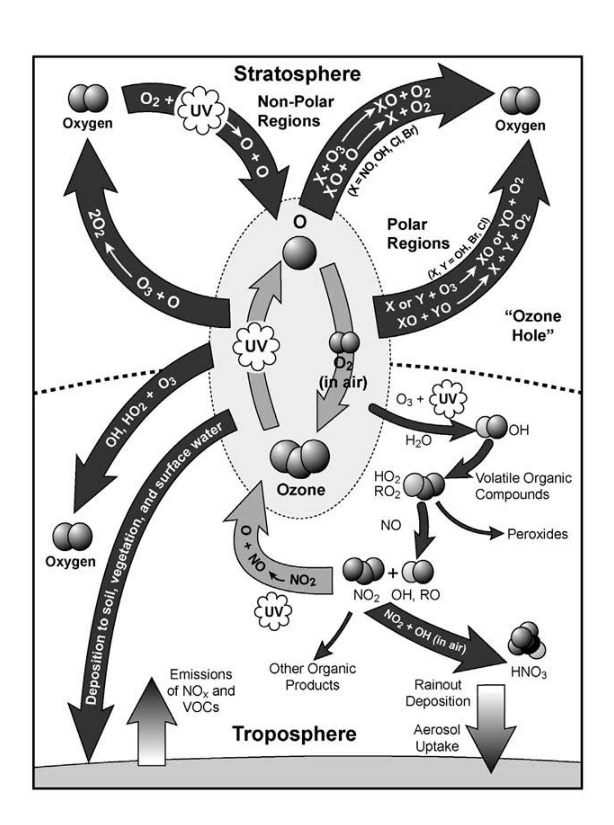


Figure 4 : Cycles de l'ozone stratosphérique et troposphérique (U.S. EPA, 2006)

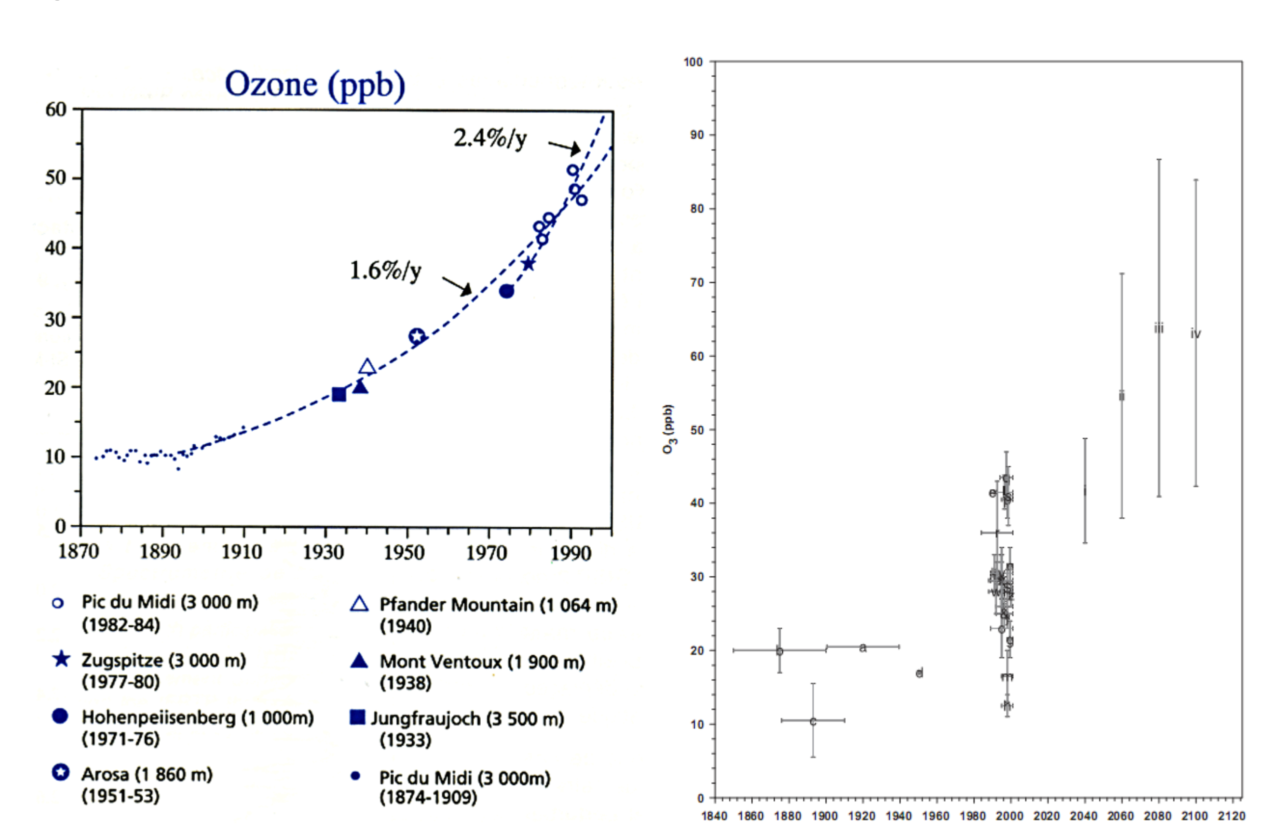


Figure 5 : Evolution des concentrations européennes en ozone (ppb) mesurées entre 1870 et 2000 (Marenco, 1994)

Figure 6 : Concentrations annuelles passées, actuelles et prédites en ozone troposphérique (Vingarzan, 2004).

Dans la troposphère les même réactions ont lieu mais sont néanmoins limitées par le faible rayonnement UV dans la troposphère. Un cycle de l'ozone troposphérique décrit la formation naturelle limitée d'ozone à partir des précurseurs primaires que sont les oxydes d'azote (NO_x), en présence de composés organiques volatils (VOC_s) et de lumière (Figure 4). Le cycle photochimique de l'ozone dans la troposphère repose sur la photolyse du dioxyde d'azote (NO_2) par le rayonnement des UV-A qui produit du monoxyde d'azote (NO) et un atome d'oxygène (5). L'atome d'oxygène réagit ensuite avec du dioxygène pour former de l'ozone (6). L'ozone peut alors réagir avec NO pour reformer du NO_2 (7). Les VOC peuvent néanmoins former des espèces réactives (radicaux comme $HO_2^{\cdot}$ ou $RO_2^{\cdot}$) qui vont substituer l'ozone dans cette dernière réaction (8). Les NO_x et les VOC_s produits par l'activité humaine peuvent donc déséquilibrer ce cycle et entraîner une hausse des concentrations en ozone dans la troposphère.

(5) $NO_2 + h\nu \rightarrow NO + O$

(6) $O + O_2 + M \rightarrow O_3 + M$

où M est un partenaire de collision non affecté par la réaction

(7) $NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2$

(8) $NO \rightarrow NO_2$

En été, les concentrations ponctuelles en ozone deviennent parfois si importantes que l'on parle de pics d'ozone. En effet, l'ensoleillement et la température étant plus forts, le vent plus limité dispersant moins les polluants, les réactions décrites sont favorisées.

3. Evolution des concentrations en ozone troposphérique

Les concentrations en ozone troposphérique ont été multipliées par 2 à 5 au cours du XXème siècle (Figure 5 et 6). Afin d'éviter que ces concentrations continuent de croître, des mesures ont été prises pour limiter la production des précurseurs de l'ozone par l'activité humaine (conventions de Sophia 1988 et Genève 1991), des suivis de concentration d'ozone ont été réalisés et des seuils de risque pour la santé et pour la végétation ont été définis (ICP M&M, 2004; Journal Officiel des Communautés Européennes, directive 2002/3/CE du parlement européen et du conseil). Cependant malgré la baisse des émissions de précurseurs

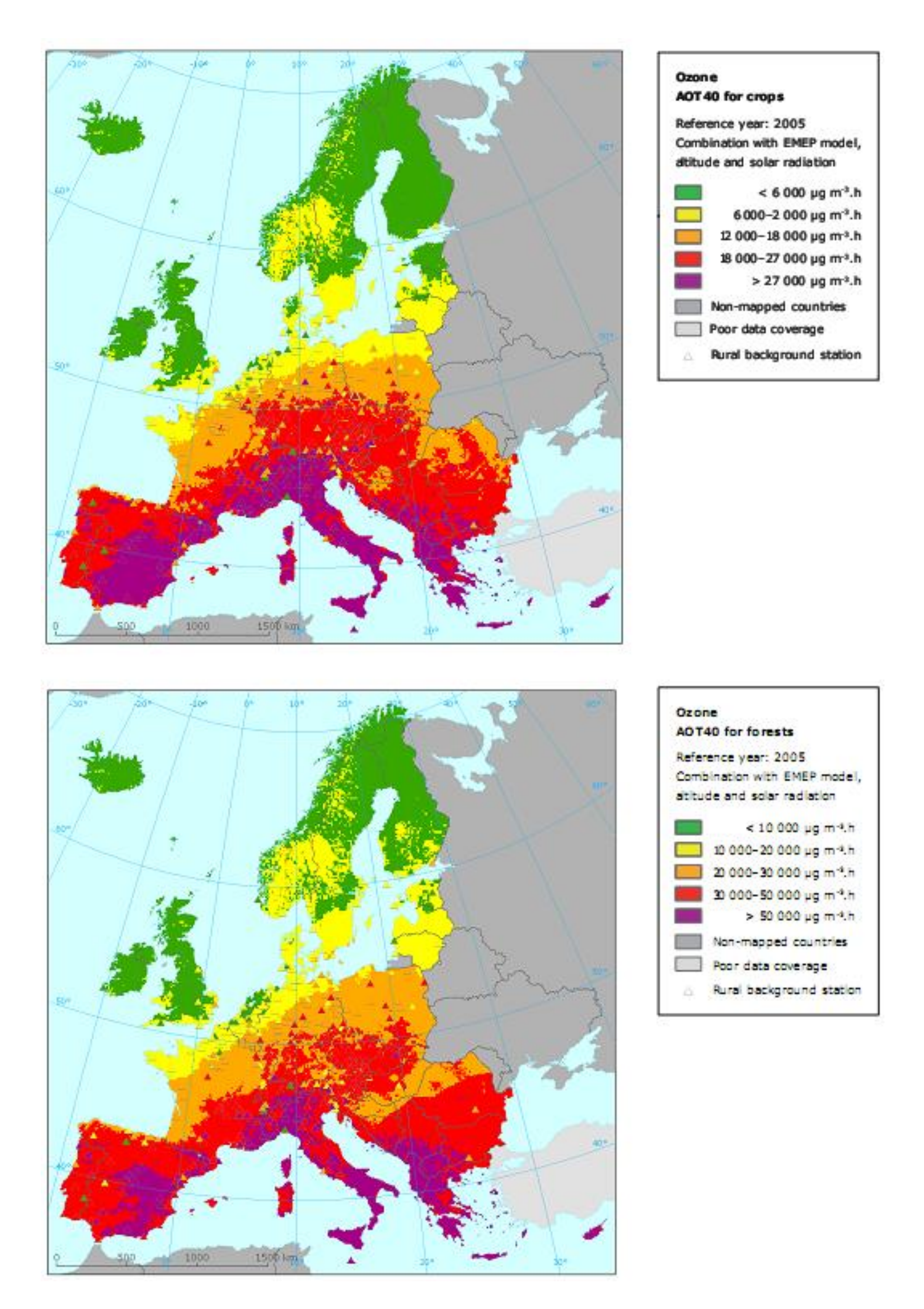


Figure 7 : Cartes des valeurs d'AOT40, indicateur de seuil de risque à l'ozone pour la végétation, en 2005, pour les cultures et pour les forêts (EEA, 2009)

en Europe, les changements climatiques (notamment les augmentations de température) et la hausse des productions de précurseurs (due en partie à l'augmentation du trafic automobile) sur d'autres continents semblent estomper la baisse attendue des concentrations en ozone en Europe (Wilson *et al.,* 2012). Sur la base de 26 modèles de prédiction différents, le changement de concentration moyenne en ozone troposphérique devrait être compris entre -5% et +15% pour 2030 (Stevenson *et al.*, 2006). L'application mondiale plus ou moins stricte des limitations de production de précurseurs et les prédictions variables concernant les changements climatiques entraînent une forte imprécision des modèles de prédiction des concentrations en ozone (IPCC, 2007; Cape, 2008; Fuhrer, 2009).

4. IMPACT DE L'OZONE SUR LA VEGETATION

L'exposition des plantes de grandes cultures est évaluée, comme définie à l'échelle de l'Europe par la Directive Ozone, selon les valeurs d'AOT40 (Accumulated Ozone over a Threshold of 40 ppb for global radiations > 50 $W.m^{-2}$) de mai à juin, tandis que celle des forêts s'étend sur toute la période de végétation, d'avril à septembre. Selon les connaissances actuelles, un niveau critique d'ozone à partir duquel des effets directs nocifs pour la végétation peuvent se produire, est fixé pour les espèces de grandes cultures et pour les forêts dans le Mapping Manual de l'ICP M&M (2004) à 6000 $\mu g.m^{-3}$ et 10000 $\mu g.m^{-3}$ respectivement. Ces niveaux étant régulièrement dépassés (Figure 7), un impact sur la végétation et les écosystèmes, ainsi que des baisses de productivité conséquentes sur l'agriculture et les activités forestières, sont à prévoir. Par exemple, en 2002 en Grèce, dans la région de Thessalonique, on estime la perte économique totale due à l'impact de l'ozone sur les cultures à 43 M€ (Vlachokostas *et al.*, 2010). Au niveau de la production forestière, on estime la perte économique en 2004 au niveau de la Suède à 56 M€ (Karlsson *et al.*, 2005). De plus, l'ozone a un effet indirect sur les capacités de séquestration du CO_2 des écosystèmes, agissant ainsi doublement sur le changement climatique (Sitch *et al.*, 2007).

SITES D'ACTION DE L'OZONE

Les flux d'ozone dans l'atmosphère sont dépendants des résistances qui s'y opposent (résistance aérodynamique, résistance de couche limite, résistance aérodynamique de la canopée, résistance intrinsèque du sol, résistance de la cuticule...). En contact avec les feuilles, l'ozone est confronté à une surface hétérogène. Les flux d'ozone à travers la cuticule sont négligeables (Kerstiens and Lendzian, 1989). Ils se réalisent essentiellement en passant

par les stomates. Il convient alors d'identifier correctement les flux stomatiques entrants d'ozone. Le nombre de stomates ainsi que leur ouverture influent sur l'entrée d'O_3 (Castagna and Ranieri, 2009).

L'ozone est hautement réactif et peut interagir avec les composants de la paroi cellulaire des stomates et du mésophylle. Il est dissous en quasi totalité dans l'apoplasme produisant des ROS (Reactive Oxygen Species) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), le radical perhydroxyle ($HOO^{\cdot}$), le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hyperoxyde ($^{\cdot}O_2H$) ou l'oxygène singulet ($^1O_2$) (Langebartels *et al.*, 2002; Ashmore, 2005; Wittig *et al.*, 2007; Wittig *et al.*, 2009). Ces composés sont des molécules très toxiques pouvant modifier ou détruire les constituants cellulaires comme les protéines, les lipides, les pigments, les acides nucléiques... (Ishida *et al.*, 1999). Cependant, les ROS sont aussi des molécules de signalisation produites naturellement par la plante (Mittler *et al.*, 2004; Karuppanapandian *et al.*, 2011). Les ROS sont majoritairement produites au niveau des chloroplastes lors de la photosynthèse et la photorespiration (Asada, 2006), des mitochondries par la chaîne de transport des électrons (Rhoads *et al.*, 2006), des peroxysomes lors de la photorespiration (Del Rio *et al.*, 2006). Les ROS interviennent notamment dans le contrôle de la réponse de défense aux pathogènes et du programme de mort cellulaire (Foyer and Noctor, 2005). Le peroxyde d'hydrogène est relativement stable et son habileté à traverser les membranes, notamment par les aquaporines, en fait un bon messager (Bienert *et al.*, 2007). Il peut néanmoins être transformé en radical hydroxyle par la réaction de Fenton catalysée par des ions métalliques libres (Fe et Cu) (9) (10) et la réaction de Haber-Weiss (11). Les radicaux superoxyde et hyperoxyde sont en équilibre dans les cellules vivantes. La forme hyperoxyde étant plus hydrophobe, elle pénètre plus facilement les bicouches lipidiques des membranes. Dans des conditions de pH neutre ou légèrement acide, ces deux radicaux peuvent, dans des milieux aqueux, se dismuter en H_2O_2 et O_2 spontanément ou sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD) (Wojtaszek, 1997) (12) (13) (14). Un équilibre entre production et détoxication régule la toxicité et la signalisation des ROS (Mittler *et al.*, 2004).

Réactions de Fenton:

(9) $H_2O_2 + Fe^{2+} (Cu^+) \rightarrow Fe^{3+} (Cu^{2+}) + {}^{\cdot}OH + OH^-$

(10) $O_2^{\cdot-} + Fe^{3+} (Cu^{2+}) \rightarrow Fe^{2+} (Cu^+) + O_2$

Réactions de Haber-Weiss:

(11) $H_2O_2 + O_2^{\cdot -} + {}^{\cdot}OH + OH^- + O_2$

Dismutation de superoxyde:

(12) $2\,{}^{\cdot}O_2H \leftrightarrow H_2O_2 + O_2$

(13) $2\,{}^{\cdot}O_2H + O_2^{\cdot -} + H^+ \leftrightarrow H_2O_2 + O_2$

(14) $2\,{}^{\cdot}O2^{\cdot -} + 2\,H^+ \leftrightarrow H_2O_2 + O_2$

EFFETS VISIBLES SUR LES FEUILLES

Tandis qu’une exposition chronique à la pollution à l’ozone peut induire une perte de biomasse sans signe visible, une exposition aigüe à l’ozone entraîne l’apparition de dégâts visibles sur les feuilles ou les aiguilles des plantes, ce qui peut représenter des pertes économiques sur des espèces horticoles (ICP forests, 2010). En Europe, les niveaux ambiants d'ozone sont suffisamment élevés pour causer des blessures visibles chez les espèces natives. L'évaluation des lésions visibles est utilisée pour détecter des zones de risques potentiels où les effets de l’ozone sur les forêts sont les plus marqués. Le suivi de ces dommages foliaires est incorporé dans des programmes de surveillance à une échelle européenne dans le cadre des protocoles d’ICP-Forest et FutMon (EU Life). Les dégâts foliaires dus à l’ozone peuvent se voir à l’œil nu et sont caractéristiques de ce polluant. Ces symptômes sont plus marqués sur les feuilles âgées, où ils apparaissent en premier, et moins importants sur les feuilles d’ombre, où ils sont presque inexistants. Ils se limitent généralement à la face supérieure des feuilles et peuvent prendre la forme d’une décoloration (Figure 8), de rougeur ou de brunissage entre les nervures, ou encore de plus ou moins grandes nécroses (Figure 8 B et C) (Vollenweider, 2003). L’ozone entraîne une chute prématurée des feuilles. Chez les conifères, comme pour les feuilles, les symptômes sont limités à la face supérieure des aiguilles et on retrouve un effet âge et un effet lumière. Les marbrures chlorotiques sont le symptôme le plus commun décrit pour les aiguilles de conifères. Elles peuvent être décrites comme une alternance de jaune ou de vert pâle de taille similaire, sans frontières nettes (Figure 8D).

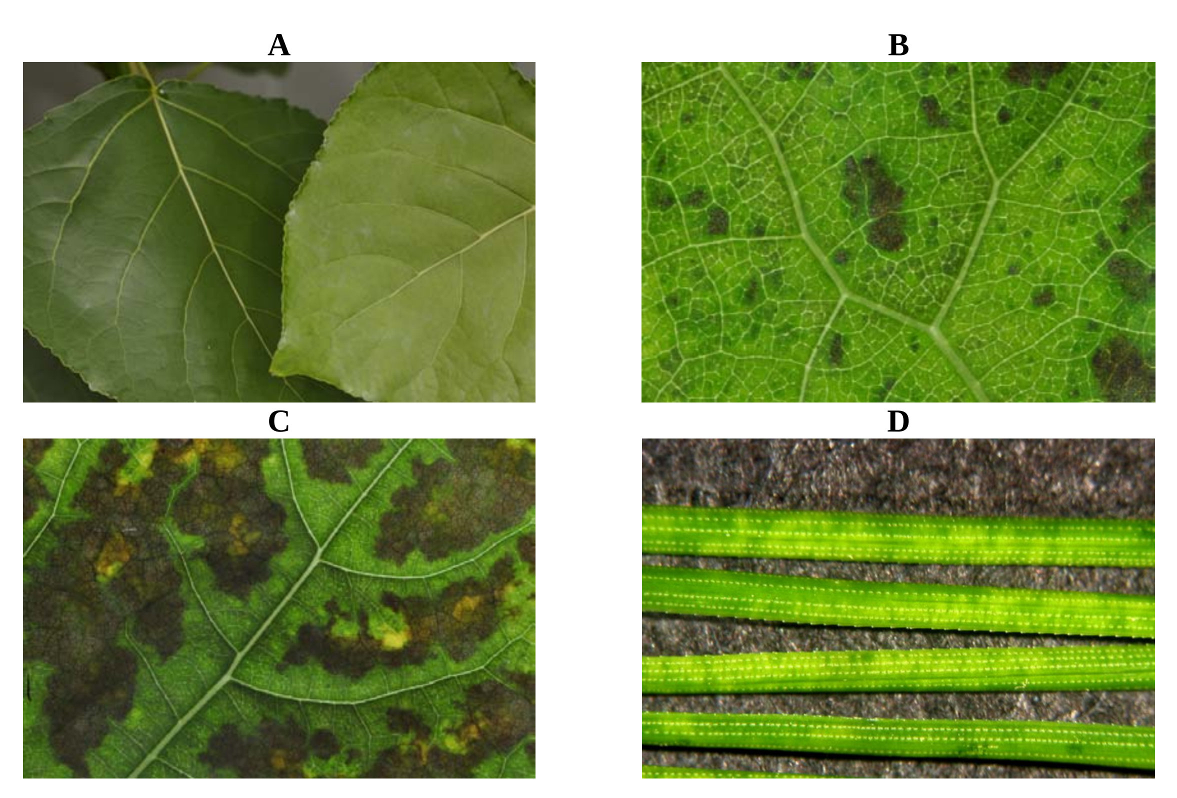


Figure 8 : Exemples de symptômes foliaires sur des feuilles de peupliers soumis à un traitement à l'ozone (Photos: F. Spicher) A) Décoloration (feuille de droite) par rapport à une feuille témoin (feuille de gauche), B) et C) nécroses plus ou moins importantes entre les nervures de feuilles de peuplier, et D) marbrures sur des aiguilles de pin d'Alep (Photo: V. Calatayud)

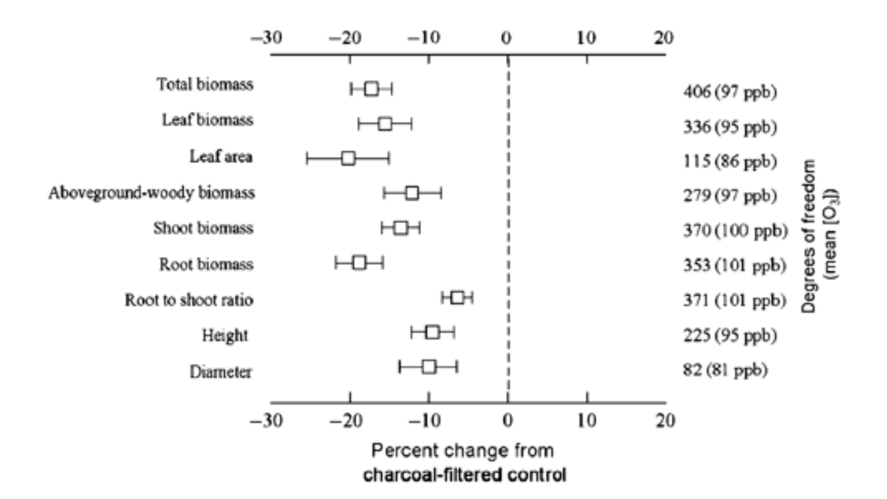


Figure 9 : Variation en pourcentage de la biomasse totale, biomasse foliaire, surface foliaire (par unité de surface), biomasse ligneuse aerienne, biomasse aérienne, biomasse racinaire et ratio feuille-racine, hauteur et diamètre de tous les arbres exposés à des concentrations élevées d'ozone par rapport aux témoins exposés à l'air filtré par charbon actif. Les symboles sont encadrés par des intervalles de confiance à 95%, les degrés de liberté et les moyennes des concentrations à l'ozone sont données le long de l'axe Y. (Wittig *et al.*, 2009)

EFFETS SUR LA BIOMASSE ET LA CROISSANCE

Les concentrations actuelles en ozone entraînent déjà une baisse de la croissance en diamètre et en biomasse chez de nombreuses espèces, dont une perte de biomasse totale de 7% chez les espèces forestières (Wittig *et al.*, 2009). On estime une baisse de rendement d'environ 4% pour le maïs, 9% pour le blé et 11% pour le soja (Avnery *et al.*, 2011; Wilkinson *et al.*, 2011). Les baisses de croissance et les pertes en biomasse à des concentrations un peu plus élevées (Figure 9) laissent envisager que, dans les années à venir, l'impact de la pollution à l'ozone sur la croissance et la biomasse sera, pour les arbres, 10% plus important qu'aujourd'hui (Wittig *et al.*, 2009). De plus, les angiospermes sont plus sensibles que les gymnospermes (Figure 10).

EFFETS SUR LES ECHANGES GAZEUX FOLIAIRES

Les concentrations actuelles en ozone (50 ppb) sont suffisantes pour réduire les capacités photosynthétiques des angiospermes (Figure 11) (Wittig *et al.*, 2007). Si les concentrations en ozone continuent de croître, la photosynthèse des gymnospermes, moins sensibles à l'ozone, pourrait elle aussi être réduite. Dans le cas d'une exposition aigüe mais ponctuelle, l'ozone entraîne une baisse réversible de la conductance stomatique et donc de la photosynthèse, tandis que dans le cas d'une exposition chronique, même à des concentrations d'ozone plus faibles, la réduction de la conductance stomatique et de la photosynthèse est cumulative (Figure 12) (Ainsworth *et al.*, 2012). Suite à une exposition chronique, l'effet de l'ozone sur la conductance stomatique a été attribué à un effet direct sur la photosynthèse, lié à une baisse de l'activité de la Rubisco, notamment due à une diminution des concentrations de l'enzyme, entraînant une hausse de la concentration interne en CO_2 (C_i) et une fermeture stomatique (Figure 13) (Dizengremel, 2001; Fiscus *et al.*, 2005). Néanmoins, il existe un effet direct de l'ozone sur le fonctionnement des cellules stomatiques, induisant des changements de la réponse dynamique des stomates impliquant un découplage de la photosynthèse et la conductance stomatique (Lombardozzi *et al.*, 2012). De plus, si l'ozone réduit les capacités photosynthétiques, la respiration est à l'inverse stimulée, tout comme l'activité de la PEPC, ce qui permet de contrebalancer en partie la diminution de la photosynthèse (Dizengremel, 2001; Dghim *et al.*, 2012).

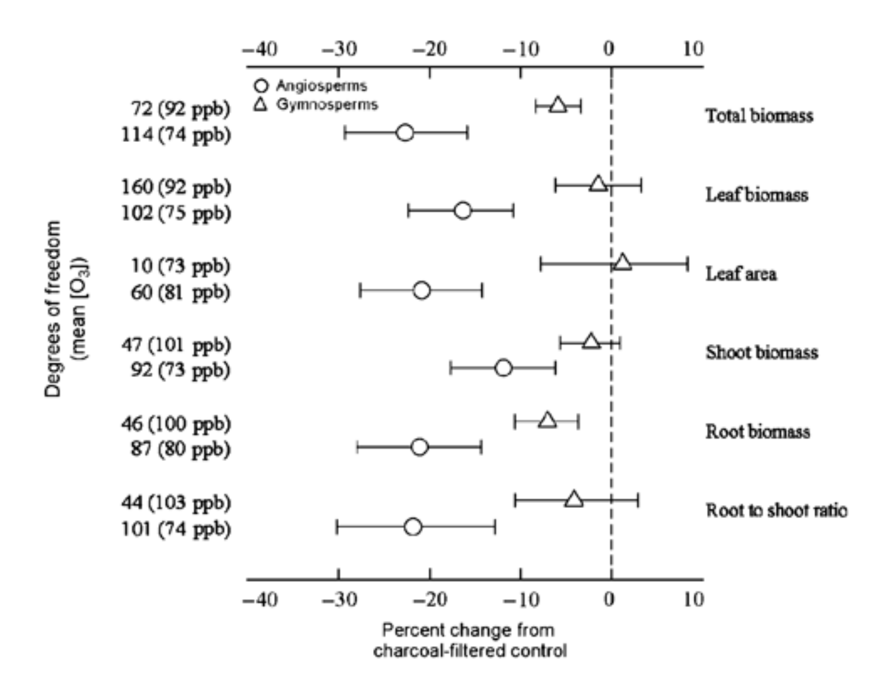


Figure 10 : Variation en pourcentage de la biomasse totale, biomasse foliaire, surface foliaire, biomasse aérienne, biomasse racinaire et ratio feuille-racine pour les gymnospermes et angiospermes exposés à des concentrations élevées d'ozone par rapport aux témoins exposés à l'air filtré par charbon actif. Les symboles sont encadrés par des intervalles de confiance à 95%, les degrés de liberté et les moyennes des concentrations à l'ozone sont données le long de l'axe Y. (Wittig *et al.*, 2009)

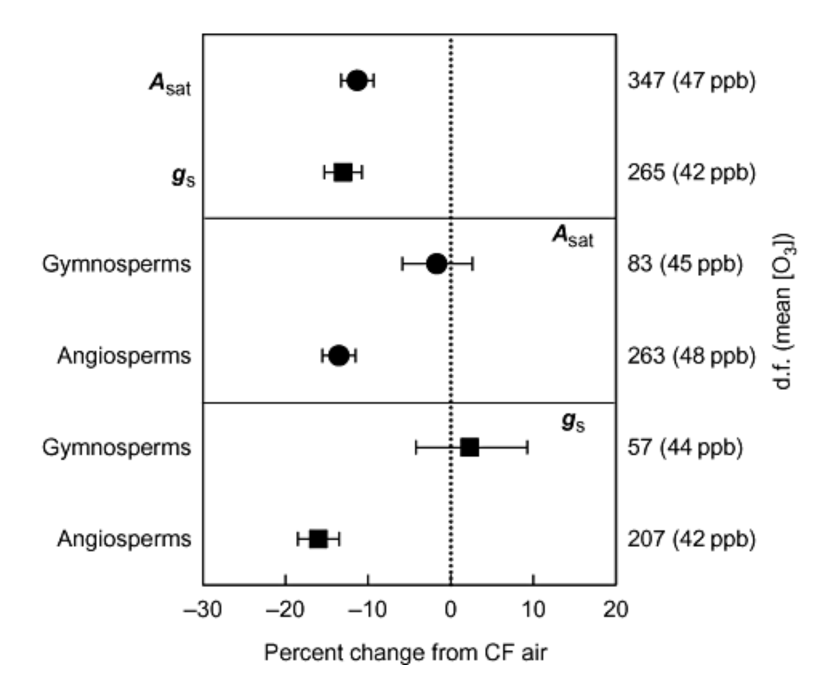


Figure 11 : Variation en pourcentage de la photosynthèse en lumière saturante (A_{sat}) et de la conductance stomatique (g_s) des arbres soumis à des concentrations ambiantes en ozone (O_3) par rapport aux témoins exposés à l'air filtré par charbon actif (cf) en incluant les différences entre gymnospermes et angiospermes. Les degrés de liberté (d.f.) et les concentrations ambiantes moyennes en ozone [O_3] sont donnés le long de l'axe y. (Wittig *et al.*, 2007)

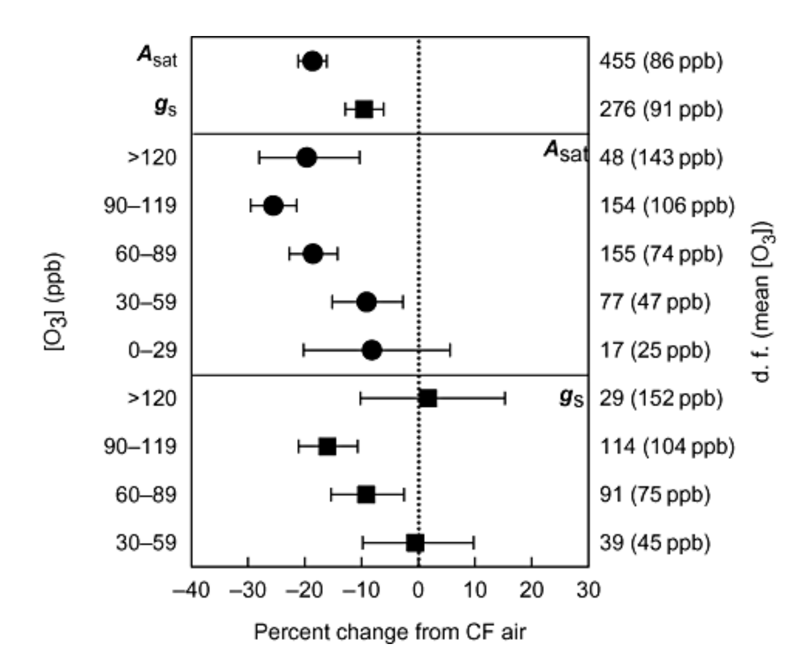


Figure 12 : Variation en pourcentage de la photosynthèse en lumière saturante (A_{sat}) et de la conductance stomatique (g_s) des arbres soumis à des concentrations élevées en ozone (O_3) par rapport aux témoins exposés à l'air filtré par charbon actif (cf) et l'impact de différentes concentrations en ozone [O_3] sur la réponse. Les degrés de liberté (d.f.) et les concentrations en ozone sont donnés le long de l'axe y. (Wittig *et al.*, 2007)

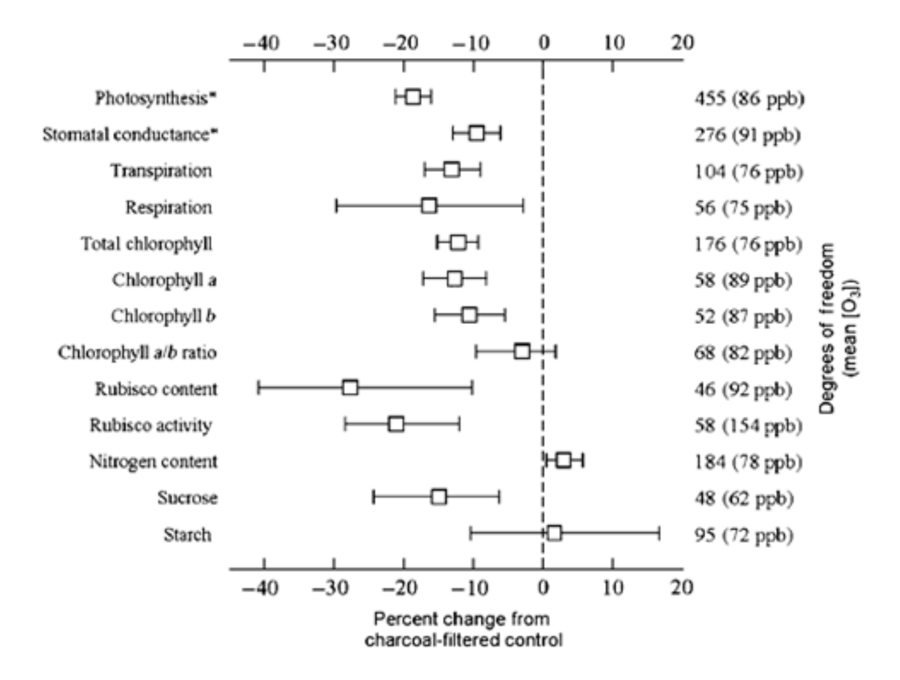


Figure 13 : Variation en pourcentage de la photosynthèse, de la conductance stomatique, de la transpiration, de la respiration, de la chlorophylle totale, de la chlorophylle a, de la chlorophylle b, du ratio entre chlorophylle a et b, du contenu en rubisco, de l'activité de la rubisco, du contenu en nitrogène, du sucrose et de l'amidon des arbres soumis à des concentrations élevées en ozone par rapport aux témoins exposés à l'air filtré par charbon actif. Les degrés de liberté (d.f.) et les concentrations ambiantes moyennes en ozone [O_3] sont donnés le long de l'axe y. (Wittig *et al.*, 2009)

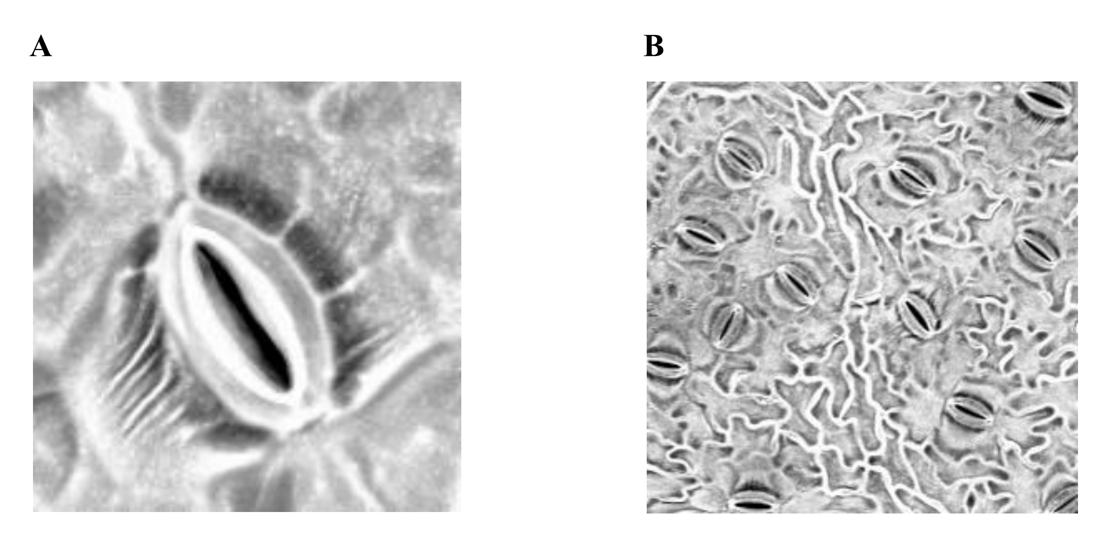


Figure 14 : A) Stomate et B) épiderme inférieur de feuille de peuplier observés au microscope électronique à balayage.

EFFETS BIOCHIMIQUES

Au niveau cellulaire, l'ozone entraîne une hausse des ROS qui va induire toute une cascade d'évènements et des modifications biochimiques importantes. Outre la réduction de l'activité et des concentrations de la Rubisco, la réduction du contenu en chlorophylles provoquée par l'ozone va impacter négativement la disponibilité en carbone (Figure 13). Un coût en carbone est ajouté pour lutter contre les effets de l'ozone, sous la forme d'une synthèse de métabolites impliqués dans les processus de détoxication des ROS (ascorbate, glutathion, caroténoïdes, flavonoïdes…), d'une production supplémentaire des enzymes neutralisant les ROS (peroxydase, SOD…), d'une stimulation de la voie de synthèse de la lignine et d'un cycle de réparation intense des protéines dégradées (Cabané *et al*., 2004; Ainsworth *et al.*, 2012). Les ROS produits suite à l'entrée d'ozone, altéreront l'expression de nombreuses protéines (Heath, 2008).

II. ROLE DES STOMATES

Comme nous l'avons mis en avant précédemment, les stomates représentent la première barrière mécanique de défense permettant de réguler l'entrée d'ozone dans les plantes. Ce sont les premières cellules en contact avec l'ozone, et elles sont donc susceptibles d'être soumises à un stress oxydatif important. Les stomates ont un fonctionnement complexe, qu'il est important de rappeler, et le calcul de la conductance stomatique (voir ci-après) est par conséquent, délicat et toujours améliorable.

1. GENERALITES

Les stomates sont des pores situés sur l'épiderme des parties aériennes des plantes (Figure 14). Ils sont constitués de deux cellules de gardes entourant un orifice appelé ostiole. La paroi des cellules stomatiques est dissymétrique et plus épaisse du côté interne. Les stomates contrôlent deux des plus importants processus des plantes, la photosynthèse et la transpiration. Plus de 95% du dioxyde de carbone (entrant pour la photosynthèse) et de la vapeur d'eau (sortante pour la transpiration et le refroidissement de la surface foliaire) échangés entre la feuille et l'atmosphère passent par les stomates. De par ces fonctions, ils sont essentiels pour la croissance des plantes et sont de première importance dans toutes les considérations de rendements des cultures.

Tableau 1: Equations des principaux modèles de calcul de conductance stomatique, issu de Damour *et al*. (2010)

1.	Jarvis 1976	$g_s = f_1(Q) \cdot f_2(T_l) \cdot f_3(VPD) \cdot f_4(C_a) \cdot f_5(\Psi_l)$
2.	White *et al.* 1999	$g_s = g_{smax} \cdot f(Q) \cdot f(T_l) \cdot f(VPD)$
3.	Noe & Giersch 2004	$g_{s,w} = g_{smax} \cdot \min[f(Q), f(VPD)]$
4.	Lohammer *et al.* 1980	$g_s = \dfrac{1}{\left(1 + \dfrac{VPD}{D_0}\right)}$
5.	Monteith 1995	$g_s = g_{smax} - a \cdot VPD$
6.	Monteith 1995	$g_s = a(1 - b \cdot E)$
7.	Delwiche & Cooke 1977	$A_{st} = \pi \cdot L_a \cdot L_b \qquad L_b = f(P_g, P_{sub})$ +a set of diffential equations integrated P_g et P_{sub}, water potentials, osmotic potentials, water vapour resistances and water fluxes
8.	Dewar 1995	$g_s = \chi(P_g - P_a) \qquad g_s = \chi(\Delta\pi - \Delta\Psi)$ $\Delta\Psi = \dfrac{E}{k} \qquad \Delta\pi = f(A_{net}, C_i, g_s)$
9.	Ball *et al.* 1987	$g_s = g_0 + a \cdot A_{net} \dfrac{H_r}{C_s} \qquad g_s = g_0 + g_{bwb} \dfrac{A_{net} \cdot H_r}{C_s}$
10.	Aphalo & Jarvis 1993	$g_s = \dfrac{A_{net}}{C_s}[k_0 + k_1 \cdot VPD + k_2 \cdot T_l + k_3 \cdot T_l \cdot VPD]$
11.	Leuning 1990	$g_s = g_0 + a \cdot A_{net} \dfrac{H_r}{C_s - \Gamma}$
12a	Leuning 1995	$g_s = g_0 + a \dfrac{A_{net}}{\left(1 + \dfrac{VPD}{D_0}\right) \cdot (C_s - \Gamma)} \qquad g_s = g_0 + g_L \dfrac{A_{net}}{\left(1 + \dfrac{VPD}{D_0}\right)(C_s - \Gamma)}$
12b 12c	Supply function and biochemical model of A_{net}	$g_s = 1.6 \dfrac{A_{net}}{C_s\left(1 - \dfrac{C_i}{C_s}\right)} \qquad A_{net} = f(J_{max}, V_{cmax}, R_d, Q, C_a, H_r, T_l)$
13.	Farquhar & Wong 1984	$g_s = 10^5 p \cdot T \qquad T = f(A_{net}, E, J_{max}, V_{cmax}, Q, T_l, R_d, \mathrm{RuBP}_{pot}, \ldots)$
14.	Jarvis & Davies 1998	$g_s = G^*(A_{max} - A_{net}) \qquad G^* = G - s \cdot E$
15.	Stewart 1988	$g_s = g_{smax} \cdot f(Q) \cdot f(T_l) \cdot f(VPD) \cdot f(\delta\theta) \qquad f(\delta\theta) = 1 - \exp[k_6(\delta\theta - \delta\theta_m)]$
16.	Misson *et al.* 2004	$g_s = f(Q) \cdot f(T_l) \cdot f(VPD) \cdot f(\Psi_{pd}) \qquad f(\Psi_{pd}) = g_{smax} - a(\Psi_{min} - \Psi_{pd})$
17.	MacFarlane *et al.* 2004	$g_s = g_{smax} \cdot f(Q) \cdot f(T_l) \cdot f(VPD) \cdot f(\Psi_{pd})$ $f(\Psi_{pd}) = 1.09 \exp^{-1.27S(\Psi)} \qquad S(\Psi) = \dfrac{1}{n}\sum(-\Psi_{pd} - 0.2)$
18.	Ogle & Reynolds 2002	$g_s = \begin{cases} 0 & \text{if } VPD > \exp(-b_0/m) \\ g_{smax} & \text{if } VPD > \exp(-(b_0 - \tau)/m) \\ g_{smax} \dfrac{m \cdot \ln(VPD) + b_0}{\eta} & \text{else} \end{cases}$ $g_{smax} = \tau \cdot \exp\left(\dfrac{\rho \cdot \Psi_{pd}}{T_{go}}\right) \cdot \dfrac{4(T_{max} - T_{go})(T_{go} - T_{min})}{(T_{max} - T_{min})^2}$
19.	Tenhunen *et al.* 1990	$g_{bwb} = GFAC$
20.	Baldocchi 1997	$g_{bwb} = a \dfrac{\sum P}{\sum ETP}$
21.	Sala & Tenhunen 1996	$g_{bwb} = b + a \cdot \Psi_{pd} \qquad \text{if } \Psi_{pd} < -1 \text{ MPa}$
22.	Misson *et al.* 2004	$g_{bwb} = \dfrac{m}{1 + \left(\dfrac{\Psi_{pd}}{\Psi_0}\right)^n}$
23.	Wang & Leuning 1998	$g_L = a \cdot \min\left(1; 10 \dfrac{\theta_s - \theta_t}{3(\theta_{cc} - \theta_t)}\right)$
24.	Van Wijk *et al.* 2000	$g_{bwb}, g_L = a\left[1 - k_4 \exp\left(k_5 \dfrac{\theta_{cc} - \theta_s}{\theta_{cc} - \theta_t}\right)\right]$
25.	Uddling *et al.* 2005	$g_L = a \cdot f_{season} \quad f_{season} = \min(1; k_7 + k_8 \cdot \mathrm{DOY})$
26.	Tardieu & Davies 1993	$g_s = g_0 + \alpha \cdot \exp\{[ABA] \cdot \beta \cdot \exp(\delta\Psi_l)\} \qquad [ABA] = \dfrac{J_{ABA}}{J_w + b} = \dfrac{a \cdot \Psi_r}{J_w + b}$ $J_w = \dfrac{\Psi_l - \Psi_r}{R_p}$ et $\quad J_w = \dfrac{\Psi_r - \Psi_s}{R_{sp}}$
27.	Gutschick & Simonneau 2002	$g_s = \exp(-\beta[ABA]) \cdot m \dfrac{A_{net} \cdot H_r}{C_s} + b$
28.	Oren *et al.* 1999	$g_s = \dfrac{K_{tot}}{A_L} \cdot \dfrac{\Psi_s - \Psi_l}{VPD}$
29.	Tyree & Sperry 1988 Sperry *et al.* 1998	$F = K_{AB}(\Psi_A - \Psi_B)$ architecture description
30.	Tuzet *et al.* 2003	$g_s = 1.6\left[g_0 + f(\Psi_l) \cdot a \dfrac{A_{net}}{C_i - \Gamma}\right]$ $f(\Psi_l) = \dfrac{1 + \exp(s \cdot \Psi_t)}{1 + \exp[s(\Psi_t - \Psi_l)]} \qquad E = \dfrac{\Psi_s - \Psi_l}{\chi_v}$
31.	Jones & Sutherland 1991	$\Psi_l - \Psi_s = -\dfrac{c \cdot VPD \cdot g_s}{K_{tot}(\Psi)}$ $K_{tot}(\Psi) = \begin{cases} K_{max} & \text{if } \Psi_{cav} < \Psi_l \\ K_{max} \dfrac{\Psi_l - \Psi_{100}}{\Psi_{cav} - \Psi_{100}} & \text{if } \Psi_{cav} > \Psi_l > \Psi_{100} \\ 0 & \text{if } \Psi_{100} > \Psi_l \end{cases}$
32.	Cochard *et al.* 1996a Lu *et al.* 1996	$E_{crit} = K_{tot}(\Psi_s - \Psi_{cav})$
33.	Dewar 2002	$g_s = \chi(P_g - P_a) \qquad g_s = \chi(\Delta\pi - \Delta\Psi)$ $\Delta\Psi = \dfrac{E}{k} \qquad \Delta\pi = \dfrac{(A_{net} + R_d)/C_i}{d_{min} \exp\{[ABA] \cdot \beta \cdot \exp(\delta\Psi_a)\}}$
34.	Gao *et al.* 2002	$g_s = \dfrac{1}{\beta} P_g \qquad g_s = \dfrac{1}{\beta}(\Psi_g - \pi_g)$ $g_s \cdot VPD = K_{tot}(\Psi_s - \Psi_g) \qquad \pi_g = \pi_0 - \alpha \cdot Q$
35.	Buckley *et al.* 2003	$g_s = \chi(P_g - mP_a) \qquad g_s = \chi[(\Psi_g - \pi_g) - mP_a]$ $g_s \cdot VPD = K_{tot}(\Psi_s - \Psi_g) \qquad \pi_g = f(T, P_a)$

2. MODELES DE CONDUCTANCE STOMATIQUE

Comme la régulation de la conductance stomatique joue un rôle clé dans l'adaptation aux variations des conditions environnementales, notamment en situation de stress, il apparaît d'une importance capitale d'améliorer notre compréhension de ces mécanismes afin de pouvoir modéliser le mieux possible cet élément clé. De par son importance, le calcul de la conductance stomatique a été largement étudié au cours des 50 dernières années. Il existe un nombre important de modèles essentiellement empiriques, très peu étant mécanistes (Tableau 1). La majorité est toutefois semi-empirique, associant des fonctions empiriques à des hypothèses physiologiques (Damour *et al.*, 2010). Certains modèles généraux intègrent les principaux facteurs environnementaux régulant la conductance stomatique grâce à des fonctions empiriques à paramétrer en fonction des situations. C'est le cas du modèle multiplicatif de Jarvis (1976) et du modèle de White *et al.* (1999) qui mettent en relation les différentes fonctions du modèle par rapport à la conductance maximale, puis celui de Noe et Giersch (2004) qui pondère l'influence des fonctions environnementales en ne prenant que le minimum de ces limitations. D'autres modèles calculent la réponse de la conductance stomatique non pas en fonction des paramètres environnementaux directement, mais en fonction de facteurs physiologiques comme la photosynthèse. C'est le cas du modèle de Ball, Woodrow et Berry (1987) qui a ensuite été amélioré par Aphalo et Jarvis (1993) pour prendre en compte de manière explicite la dépendance de la conductance stomatique à l'humidité de l'air et à la température. D'autres modifications du modèle ont été faites afin d'en améliorer les résultats (Leuning, 1990; Leuning, 1995), mais il est important de souligner qu'un tel modèle nécessite d'être couplé à un modèle approprié de photosynthèse comme le modèle de Farquhar *et al.* (1980).

Le calcul de la conductance stomatique à l'ozone, g_s, consiste à appliquer un facteur de diffusion au calcul de la conductance stomatique à la vapeur d'eau, g_{sw} (15). Le modèle d'Emberson-Jarvis (16) utilise une conductance stomatique maximale et des fonctions réductrices dépendantes de facteurs environnementaux (phénologie, lumière, température, déficit de pression de vapeur d'eau (VPD), potentiel hydrique du sol *(swp)*). Mais celui-ci ne tient pas compte de l'impact temporel de l'ozone sur la conductance stomatique, il faut donc réussir à inclure une fonction ozone, fO_3, dans le modèle comme l'ont fait Danielsson *et al.* (2003) sur la pomme de terre. L'ozone ayant des répercussions sur la réponse des stomates aux facteurs environnementaux, il convient d'étudier son impact sur les différents facteurs entrant dans le calcul, afin de définir la fonction ozone et la place adéquate où l'intégrer.

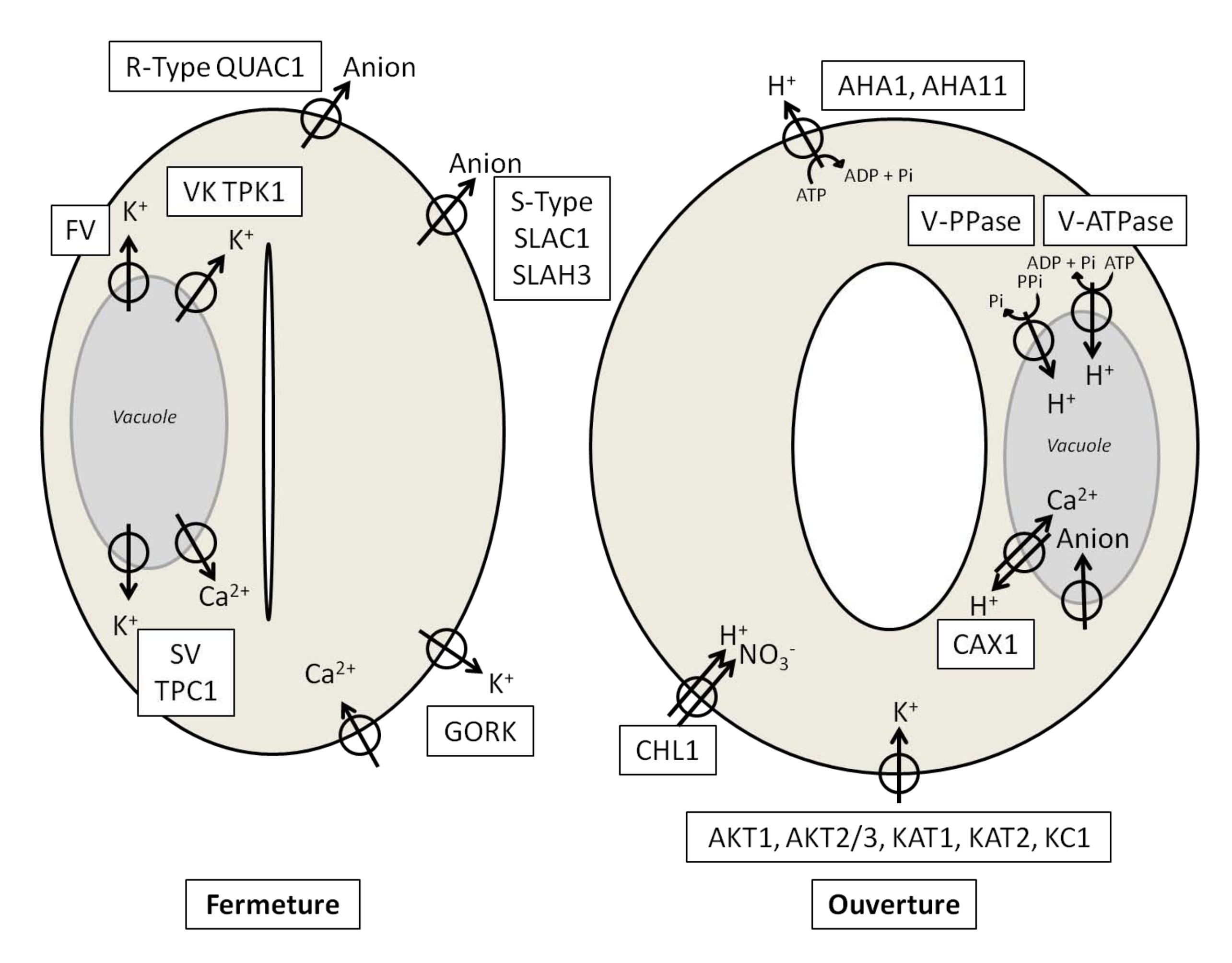


Figure 15 : Canaux et transporteurs ioniques impliqués dans les mouvements stomatiques. A gauche, les protéines de transport activées lors de la fermeture, et à droite, lors de l'ouverture des stomates. Les gènes correspondants identifiés chez Arabidopsis sont encadrés.

(15) $$g_s = g_{sw}/1.51$$

(16) $$g_{sw} = g_{max} \times f_{phen} \times f_{light} \times \max[fmin, (f_{temp} \times f_{vpd} \times f_{swp})]$$

3. REGULATION DES MOUVEMENTS STOMATIQUES

La régulation des mouvements stomatiques est un élément déterminant pour les capacités d'adaptation des plantes lors de changements de facteurs environnementaux. En effet, la conductance stomatique régule l'entrée de CO_2 et les pertes en eau au niveau des feuilles. Les variations de facteurs environnementaux entraînent la fermeture ou l'ouverture des stomates afin d'optimiser les échanges gazeux, en fonction des conditions environnementales. L'ouverture des stomates est provoquée par la force motrice liée à l'augmentation du volume des cellules de garde et la pression de turgescence causées par une entrée d'eau dans l'apoplasme. Ces flux d'eau accompagnent l'accumulation d'ions K^+ provoquée par une hyperpolarisation de la membrane, suite à l'activation d'une pompe à proton (Fischer, 1968; Outlaw and Manchester, 1979). L'ouverture stomatique est ensuite maintenue par l'accumulation de sucres. La fermeture des stomates résulte d'un processus inverse, impliquant en plus le calcium (Ca^{2+}). En effet, plusieurs facteurs comme l'acide abscissique (ABA) ou une hausse de concentration en CO_2 peuvent stimuler l'absorption de Ca^{2+} ce qui entraîne une dépolarisation de la membrane puis une sortie d'ions Cl^- et malate^{2-} et enfin une diffusion passive des ions K^+ (Hopkins, 2003; Lawson, 2009). Les flux d'ions permettant les mouvements stomatiques nécessitent la participation de nombreux canaux plasmiques et vacuolaires (tonoplastiques) (Figure 15) (Pandey *et al.*, 2007).

EFFET DU VPD (VAPOR PRESSURE DEFICIT) ET DE LA TEMPERATURE

Les stomates sont sensibles au VPD et à la température, deux paramètres liés, dont les effets sont difficilement séparables. Si certaines espèces apparaissent plus ou moins sensibles aux variations de VPD, on observe cependant une réponse commune : la conductance stomatique baisse avec l'augmentation du VPD (Day, 2000; Yong *et al.*, 1997). Le mécanisme de réponse des stomates aux variations de VPD est peu connu, alors que ce paramètre environnemental est un facteur dominant par rapport aux variations de lumière ou de concentrations de CO_2, ce qui lui donne une grande importance dans la prédiction des mouvements stomatiques (Aasamaa *et al.*, 2011). Certains pensent que les mécanismes de réponse au VPD pourraient être indépendants de l'ABA (Assmann *et al.*, 2000), tandis que

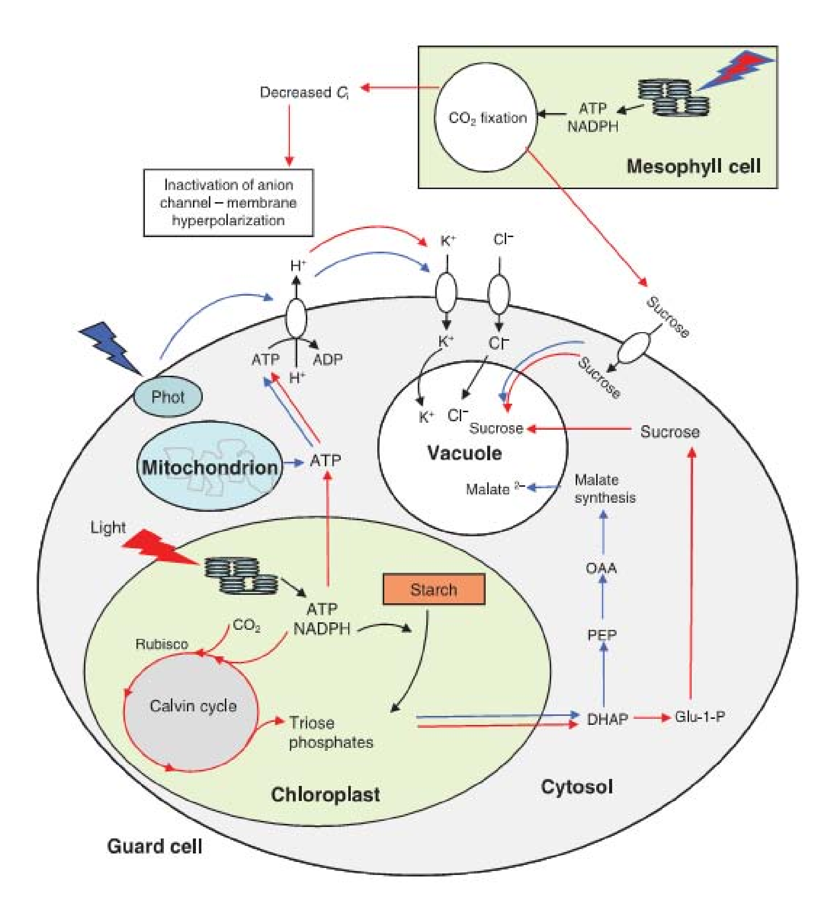


Figure 16 : Schéma de la cascade de réactions impliquée dans la réponse à la lumière bleue et à la lumière rouge (Lawson, 2009)

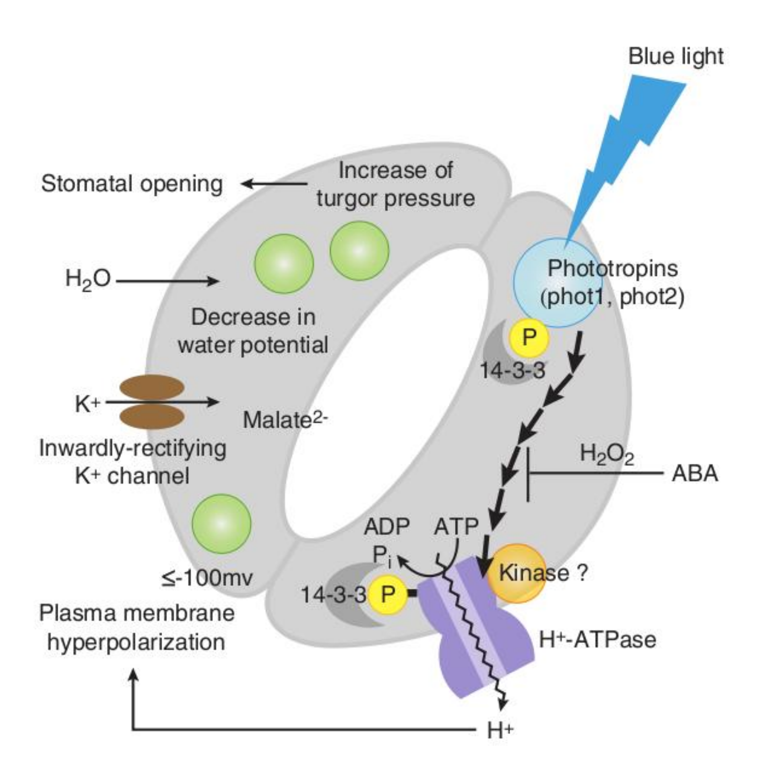


Figure 17 : Processus d'ouverture stomatique en réponse à la lumière bleue (Shimazaki, 2007)

d'autres avancent l'hypothèse que la réponse au VPD soit liée aux concentrations en ABA (Bunce, 1998; Xie *et al.*, 2006). Pour la température, on observe un optimum et la conductance baisse lorsque l'on s'éloigne de celui-ci (Jarvis, 1976). Le contrôle de la réponse stomatique aux variations de température semble lié à la respiration (Lu *et al.*, 2000).

EFFET DE LA LUMIERE

La lumière induit une ouverture des stomates. Cependant, cette ouverture dépend de l'intensité et du type de longueur d'onde de celle-ci (Figure 16), et implique plusieurs photorécepteurs tels que les cryptochromes, les phytochromes et les phototropines. De plus, la réponse à la lumière résulte d'au moins deux composantes, une composante indépendante et une autre dépendante de la photosynthèse (Wang *et al.*, 2011).

La réponse à la lumière rouge est dépendante de la photosynthèse intervenant dans le mésophylle et les cellules de garde (Lawson *et al.*, 2002; Mott 2009; Zeiger *et al.*, 2002). Le pigment impliqué dans la réponse à la lumière rouge serait la chlorophylle contenue dans les chloroplastes des cellules de garde et du mésophylle. L'importance respective de la photosynthèse dans les cellules de garde et dans le mésophylle, dans la réponse à la lumière rouge, fait actuellement débat. Des études récentes ont montré que la réponse à la lumière rouge n'est cependant pas due à la baisse de la concentration intracellulaire en CO_2 par la photosynthèse (Wang *et al*., 2008). De plus,Wang *et al*. (2010) montrent que le phytochrome B interviendrait dans la réponse à la lumière rouge. Un mutant d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant PhyB a une sursensibilité à la lumière rouge, tandis qu'inversement, le mutant négatif PhyB a une sensibilité à la lumière rouge fortement réduite.

La lumière bleue provoque une ouverture rapide des stomates. Cette réponse est principalement indépendante de la photosynthèse. Plusieurs photorécepteurs à la lumière bleue ont été candidats, la zéaxanthine et les phototropines (Kinoshita *et al*., 2001). Il est maintenant admis que les phototropines sont les récepteurs à la lumière bleue, et qu'elles induisent une phosphorylation et une activation de l'ATPase à protons membranaire, ce qui entraîne une hyperpolarisation de la membrane et une entrée massive d'ions K^+ (Figure 17). Enfin, Chez *Arabidopsis thaliana*, COP1 agit comme un régulateur négatif des signaux émis par les cryptochromes et les phototropines à la lumière bleue (Mao *et al*., 2005).

La lumière rouge active la photosynthèse et stimule l'accumulation de sucrose dans les cellules de garde en l'absence d'apport d'ions K^+, alors que la lumière bleue stimule l'entrée

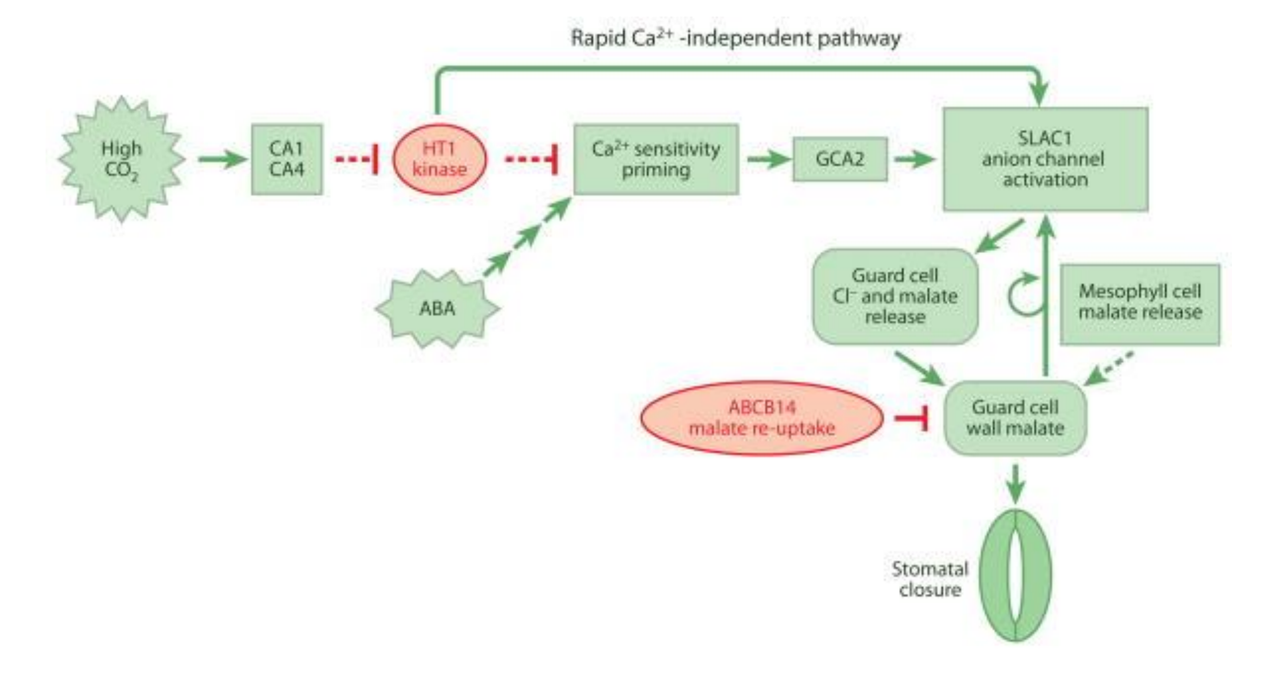


Figure 18 : Modèle simplifié illustrant les fonctions de gènes récemment identifiés et de mécanismes impliqués dans le contrôle des mouvements stomatiques en réponse au CO_2 (Kim *et al.*, 2010).

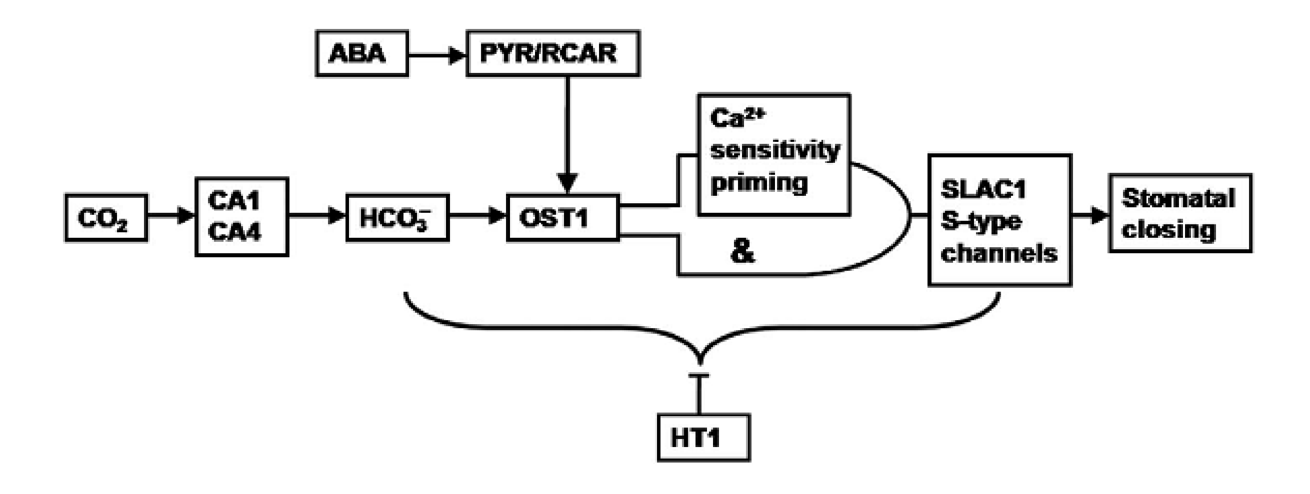


Figure 19 : Nouveau modèle montrant la séquence d'évènements induits par le CO_2 entraînant l'activation des canaux anioniques de type S et la fermeture des stomates (Xue *et al.*, 2011)

de K^+ et de Cl^-, la synthèse de malate et l'hydrolyse de l'amidon (Zeiger *et al.*, 2002). De plus, les cryptochromes CRY1 et CRY2 agissent, en plus des phototropines, lors de la réponse des stomates à la lumière bleue et en parallèle des phytochromes, lors de la réponse à la lumière rouge (Boccalandro *et al.*, 2012). Les cryptochromes interviendraient dans la réponse à la lumière bleue et à la lumière rouge, en réduisant les niveaux d'ABA. D'une manière générale, il semble que PhyB agisse de concert avec les phototropines, les cryptochromes et le phytochrome A dans la réponse à la lumière blanche (Wang *et al.*, 2010).

EFFET DU CO_2

Une forte concentration en CO_2 entraîne une fermeture des stomates tandis que des concentrations faibles vont avoir l'effet inverse. En effet, le CO_2 va activer les canaux anioniques, et provoquer un fort efflux d'ions K^+, entraînant une sortie de Cl^- et de malate^{2-} et une dépolarisation de la membrane (Figure 18) (Kim *et al*., 2010). Cependant, les étapes du signal précédent l'activation des canaux anioniques restent encore mal connues, bien que des avancées aient permis l'élaboration d'un nouveau modèle de réponse au CO_2 (Figure 19) (Xue *et al*., 2011). La forte concentration en CO_2 va, par le biais des anhydrases carboniques βCA1 et βCA4, entraîner une hausse de la concentration en HCO_3^-. Deux cascades de signaux se mettent en place. Indépendamment des concentrations en Ca^{2+}, la forte concentration en CO_2 et HCO_3^- va activer les canaux ioniques de type S (Hu *et al*., 2010), inhiber les canaux d'entrée de K^+, inhiber les ATPases entraînant ainsi la fermeture des stomates et l'inhibition de l'ouverture stomatique. En parallèle, les canaux anioniques SLAC1-dépendants vont aussi être activés par l'amorçage de la sensibilité au Ca^{2+} (Figure 20).

Les signaux de fermeture des stomates dus au CO_2 et à l'ABA deviennent les mêmes à partir de cet instant, bien que les récepteurs soient différents (Xue *et al*., 2011). Dans les deux cas, la sensibilité est amorcée, et les deux signaux deviennent commun avant ou à partir de la protéine kinase OST1 aussi appelée SnRK2.6 et SnRK2E. Contrairement au CO_2, l'action de l'ABA se base sur le modèle PYR/RCAR–PP2C–SnRK2, décrit par Hubbard *et al.* (2010), pour activer OST1 (Figure 21). Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider les mécanismes par lesquels les stimuli au CO_2 et à l'ABA amorcent la sensibilité au Ca^{2+}. Enfin, il faut rappeler que la protéine kinase HT1 joue un rôle important dans la régulation du mouvement stomatique sous forte concentration en CO_2. Elle agit comme un régulateur négatif majeur (Hashimoto *et al*., 2006).

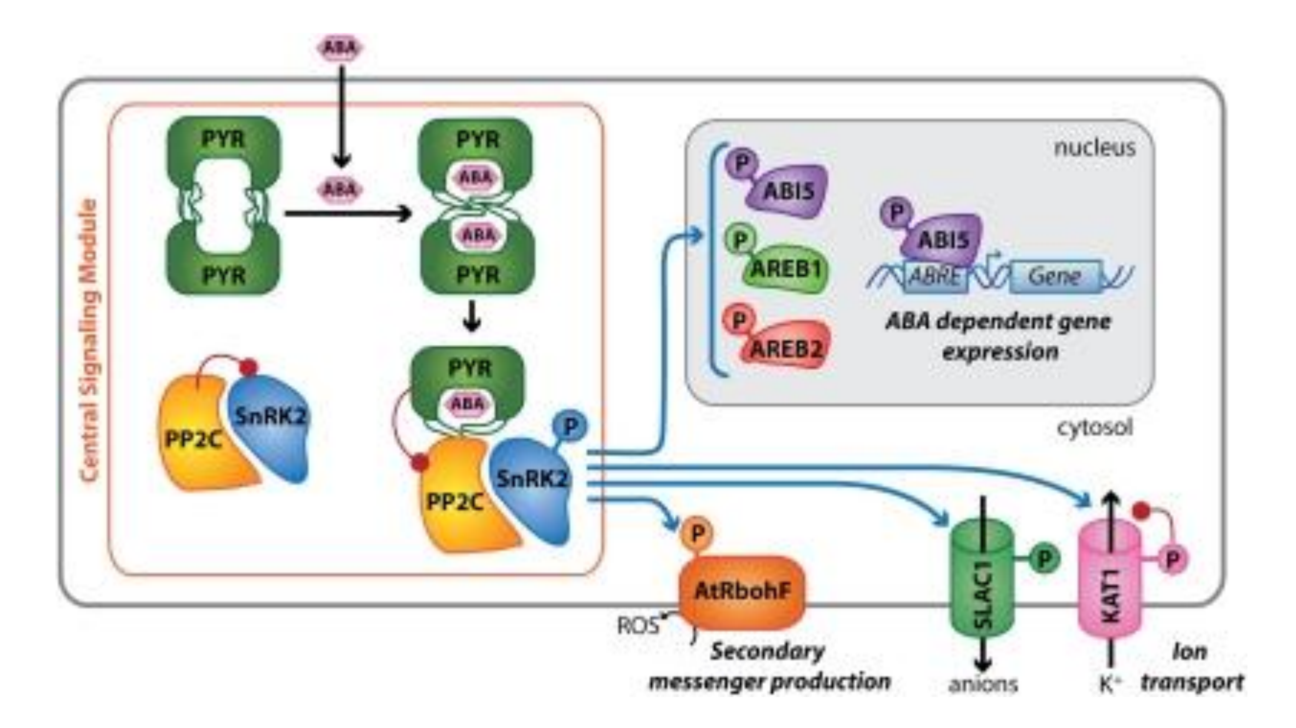


Figure 20 : Schéma illustrant le modèle PYR/RCAR-PP2C-SnRK2 de réponse à l'ABA (Hubbard *et al*., 2010)

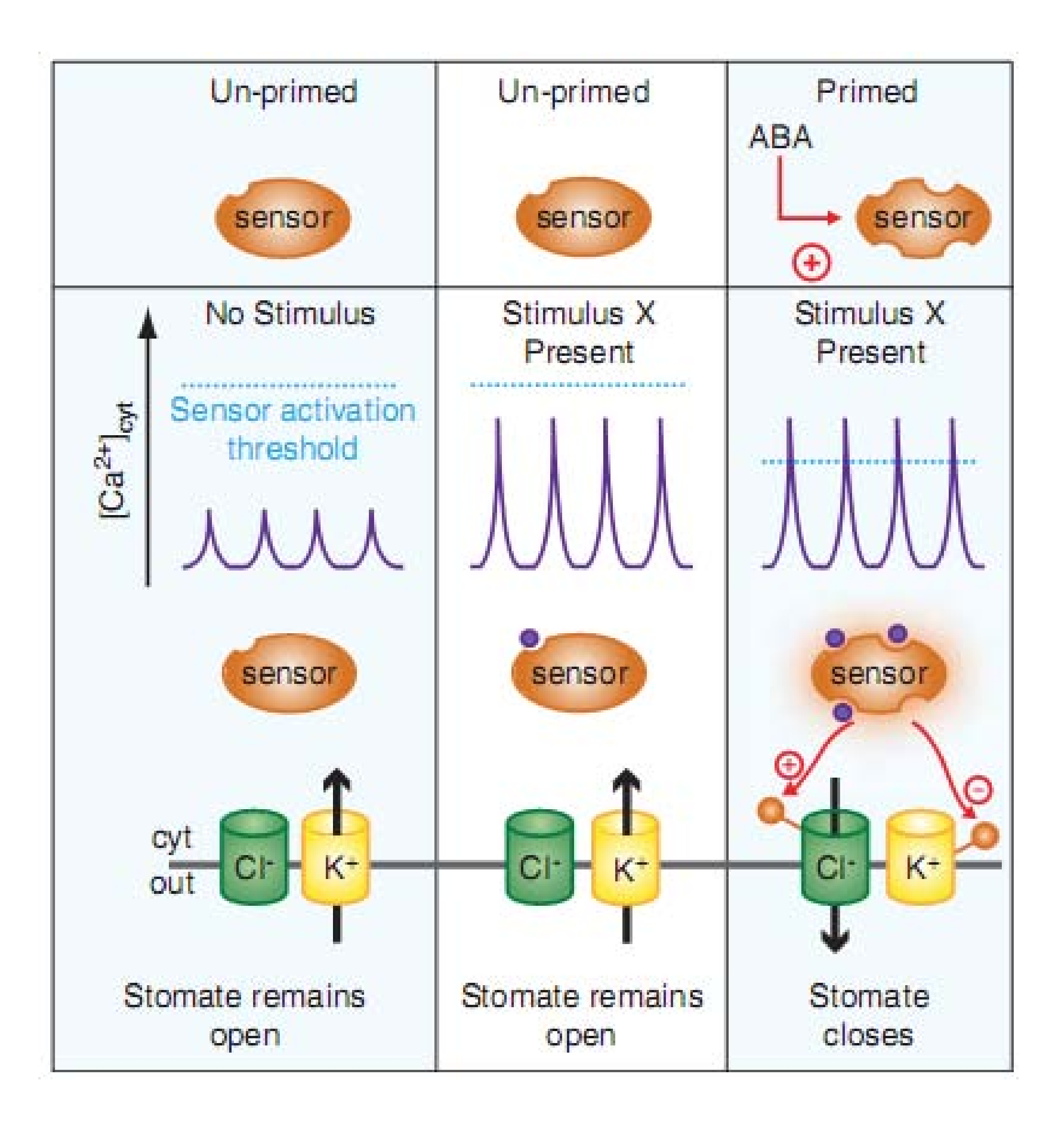


Figure 21 : Modèle d'amorçage de la sensibilité au Ca^{2+} (Hubbard *et al*., 2011). L'amorçage et l'augmentation des [Ca^{2+}] sont nécessaires pour l'activation des canaux anioniques et potassiques de type-S résultant en la fermeture des stomates.

EFFETS DE L'OZONE

D'une manière générale l'ozone entraîne une réduction de la conductance stomatique. Cependant, les mécanismes de perception de l'ozone et la cascade signalétique associée sont toujours inconnus. Néanmoins, il a été montré que les mutants de *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis thaliana, NtMPK4, ost1, abi1-1, abi2-1* et *slac1* ont une sensibilité à l'ozone accrue, due à une conductance stomatique supérieure et à une régulation de la conductance stomatique perturbée en réponse à l'ozone. (Gomi *et al.*, 2005; Marten *et al.*, 2008 Vahisalu *et al.*, 2010). Ces travaux indiquent l'implication des canaux anioniques et de phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation de protéines dans la réponse des cellules de garde à l'ozone.

De plus, suite à un stress ozone, la réponse des stomates aux autres facteurs environnementaux est modifiée. En effet, après un traitement ozone, les stomates ont une vitesse d'ouverture et de fermeture plus lente en réponse aux variations de lumière (Paoletti, 2005; Paoletti and Grulke, 2010). Le même effet est observé pour la réponse à une variation de VPD (Grulke *et al.*, 2007).

III. SYSTEMES DE DETOXICATION

1. SYSTEME DE DEFENSE ANTIOXYDATIF

Les défenses de la plante comprennent la capacité à restreindre les flux d'ozone entrants dans les tissus (reflétée par les modifications de la conductance stomatique), mais aussi à détoxiquer l'ozone une fois les stomates franchis. Un système de détoxication, constitutif puis inductif, agit sur les ROS pour limiter le stress oxydatif (Wieser and Matyssek, 2007). La détoxication constitutive est déjà opérationnelle à l'entrée de l'ozone dans les feuilles. En effet, les ROS étant produits naturellement dans différents compartiments cellulaires, les acteurs de la détoxication sont toujours actifs. Chaque compartiment cellulaire contient ses propres agents de détoxication. L'ascorbate présent dans l'apoplasme sous forme réduite (ASA) constitue la première barrière à s'opposer à l'ozone et aux ROS (Castagna and Ranieri, 2009). Plus les concentrations en ozone et en ROS sont fortes, plus l'ascorbate réduit sera oxydé. La détoxication inductive renforce la détoxication constitutive en produisant et en régénérant les antioxydants, mais nécessite beaucoup d'énergie (Musselman *et al.*, 2006), alors que la photosynthèse est limitée par l'ozone. Le métabolisme primaire joue alors un rôle

important pour supporter ces processus. Les sucres solubles en tant que source d'énergie représentent de ce fait un facteur clé. De plus, ils associent un rôle de signalisation impactant l'expression de gènes (Gupta et Kaur, 2005) à des capacités d'osmoprotection et de détoxication, notamment le galactinol et le raffinose qui seraient capables de détoxiquer les radicaux hydroxyles (Nishizawa *et al.*, 2008). Le pouvoir réducteur des systèmes de détoxication dérive directement ou indirectement du NAD(P)H ou de la ferrédoxine (sauf la SuperOxyde Dismutase (SOD) et la catalase) (Dizengremel *et al.*, 2008; Moller *et al.*, 2007) (Figure 22), rendant le maintien d'un pool de NADPH par le métabolisme primaire, essentiel à la détoxication inductive.

2. VOIE D'HALLIWELL-ASADA

Le rôle antioxydant de l'ascorbate est directement dépendant de la capacité de la cellule à le maintenir à son état réduit. La voie d'Halliwell-Asada (Figure 23) est alors sollicitée (Dizengremel *et al.*, 2008). L'entrée d'ozone entraîne l'apparition d'H_2O_2 dans l'apoplasme. L'ascorbate peroxydase (APX) réduit l'H_2O_2 en eau en utilisant le pouvoir réducteur de l'ascorbate (ASA) (vitamine C) qui devient du monodéhydroascorbate (MDHA).

(17) $H_2O_2 + 2\ ASA \rightarrow 2\ H_2O + 2\ MDHA$

Du déhydroascorbate (DHA) se forme ensuite spontanément par dismutation de deux MDHA.

(18) $2\ MDHA \rightarrow DHA$

Le DHA passe ensuite dans le cytosol puis dans les chloroplastes éventuellement. On y retrouve les mêmes réactions (17) et (18) pour neutraliser l'H_2O_2 réussissant à passer la membrane. De plus, la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) présente dans ces compartiments permet de régénérer l'ascorbate en utilisant du NAD(P)H selon la réaction suivante :

(19) $2\ MDHA + NAD(P)H \rightarrow 2\ ASA + NAD(P)$

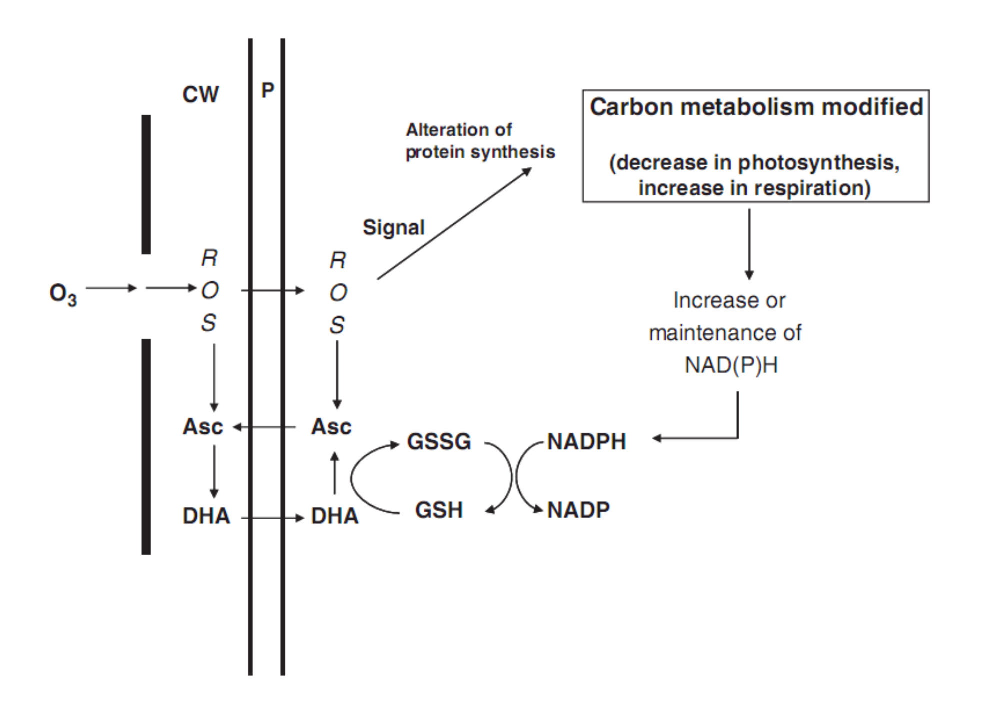


Figure 22 : Double effet des ROS générés par l'ozone sur les processus de détoxication et sur la régénération métabolique du pouvoir réducteur (Dizengremel *et al.*, 2009) Abréviations : CW : Paroi cellulaire, P : Membrame plasmique, Asc : Ascorbate réduit, DHA : Ascorbate oxydé, GSSG : Glutathion oxydé, GSH : Glutathion réduit

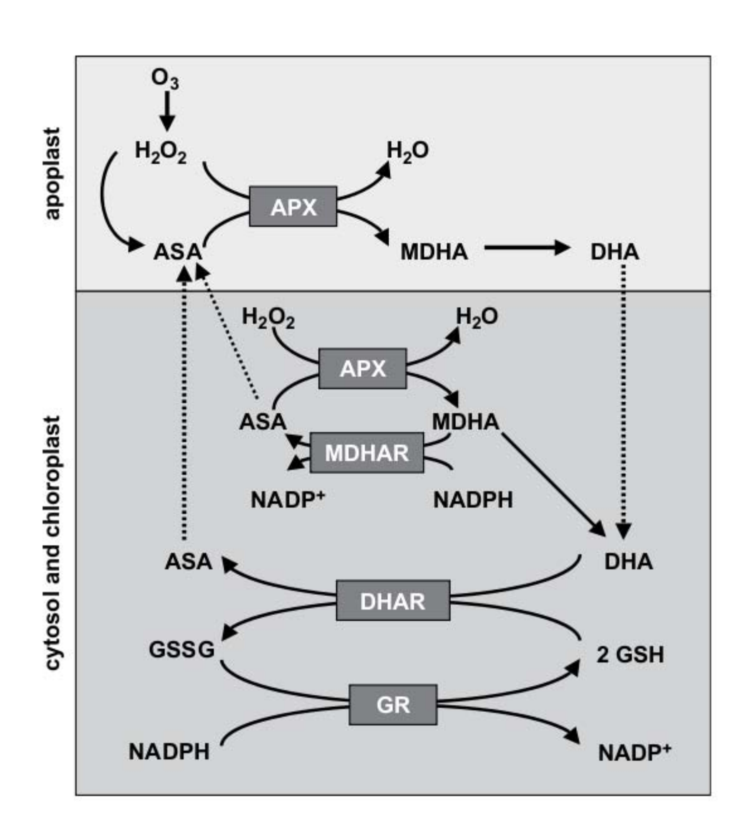


Figure 23 : Voie d'Halliwell-Asada (Castagna et Ranieri, 2009)

Tableau 2 : Mécanismes de détoxication des ROS dans les cellules végétales (Moller *et al*., 2007)

Mécanismes	Consommés (produits)	Localisation cellulaire
SOD	$O_2^{.-}$ (H_2O_2)	Chl, Cyt, Mit, Per
Catalase	H_2O_2 (H_2O)	Mit?, Per
Peroxydases (PODs)	H_2O_2 (H_2O)	Nombreuses localisations
Ascorbate/ Cycle Glutathion	H_2O_2 (H_2O)	Chl, Cyt?, Mit, Per
Glutathion peroxydases	H_2O_2 (H_2O) Lipides hydroperoxydes Autres hydroperoxydes	Chl, Cyt, RE, Mit
Système peroxyredoxine	H_2O_2 (H_2O) Alkyle hydroperoxydes Peroxynitrite	Chl, Cyt, Mit, Noy
Système Thioredoxine	H_2O_2 (H_2O)	Chl, Cyt, Mit
Système glutaredoxine	H_2O_2 (H_2O) Hydroperoxydes	Chl, Cyt, Mit, Sec
Carotènes et tocophérol	$^1O_2$ (O_2)	Chl

Chl, Chloroplastes; Cyt, Cytosol; RE, Réticulum Endoplasmique; Mit, Mitochondrie; Noy, Noyau; Per, Peroxysomes; Sec, Voie sécrétoire

La déhydroascorbate réductase réduit le DHA obtenu par dismutation spontanée (18) du MDHA, en utilisant le glutathion réduit (GSH), produisant du glutathion oxydé (GSSG) (20).

(20) $$DHA + 2\ GSH \rightarrow ASA + GSSG$$

Le glutathion oxydé est ensuite régénéré à son tour par la glutathion réductase (GR) en utilisant du NADPH (21). Puis l'ascorbate retourne dans l'apoplasme.

(21) $$GSSG + NADPH \rightarrow 2\ GSH + NADP$$

3. AUTRES ENZYMES ET MOLECULES ANTIOXYDANTES

D'autres mécanismes moins importants, ou moins connus, servent à la détoxication des ROS issus de l'ozone et viennent en complément de la voie d'Halliwell-Asada. On les retrouve répartis dans la plupart des organites des cellules (Tableau 2 et Figure 24).

Le tocophérol stabilise les radicaux produits lors de la peroxydation des lipides, stoppant ainsi les réactions en chaîne. Les caroténoïdes, dont la zéaxanthine, permettent de neutraliser l'oxygène singulet et de reconvertir le tocophérol porteur d'un radical en tocophérol. Les composants phénoliques ont généralement un fort pouvoir antioxydant, notamment les flavonoïdes quercétine, anthocyanidines cyanidine et delphinidine (Rice-Evans *et al.*, 1997). Les anthocyanines peuvent détoxiquer l'H_2O_2. Il se peut donc qu'ils agissent dans les mécanismes de détoxication de l'ozone. Les superoxydes dismutases (SOD) sont des enzymes qui lient deux ions superoxydes à deux ions hydrogène pour produire de l'oxygène moléculaire et de l'eau oxygénée, neutres et moins toxiques. La catalase est une enzyme qui dismute le peroxyde d'hydrogène en eau. Les peroxydases sont une famille d'enzymes catalysant la dégradation du peroxyde d'hydrogène avec comme second substrat un composé réducteur. L'ascorbate peroxydase et la glutathion peroxydase en font partie.

4. VOIE DE BIOSYNTHESE DE L'ASCORBATE

L'ascorbate est un élément important pour la régulation des radicaux libres oxygénés dans plusieurs compartiments cellulaires à travers la voie d'Halliwell Asada. La voie de synthèse principale de l'ascorbate utilise le galactose (Figure 25), cependant d'autres voies

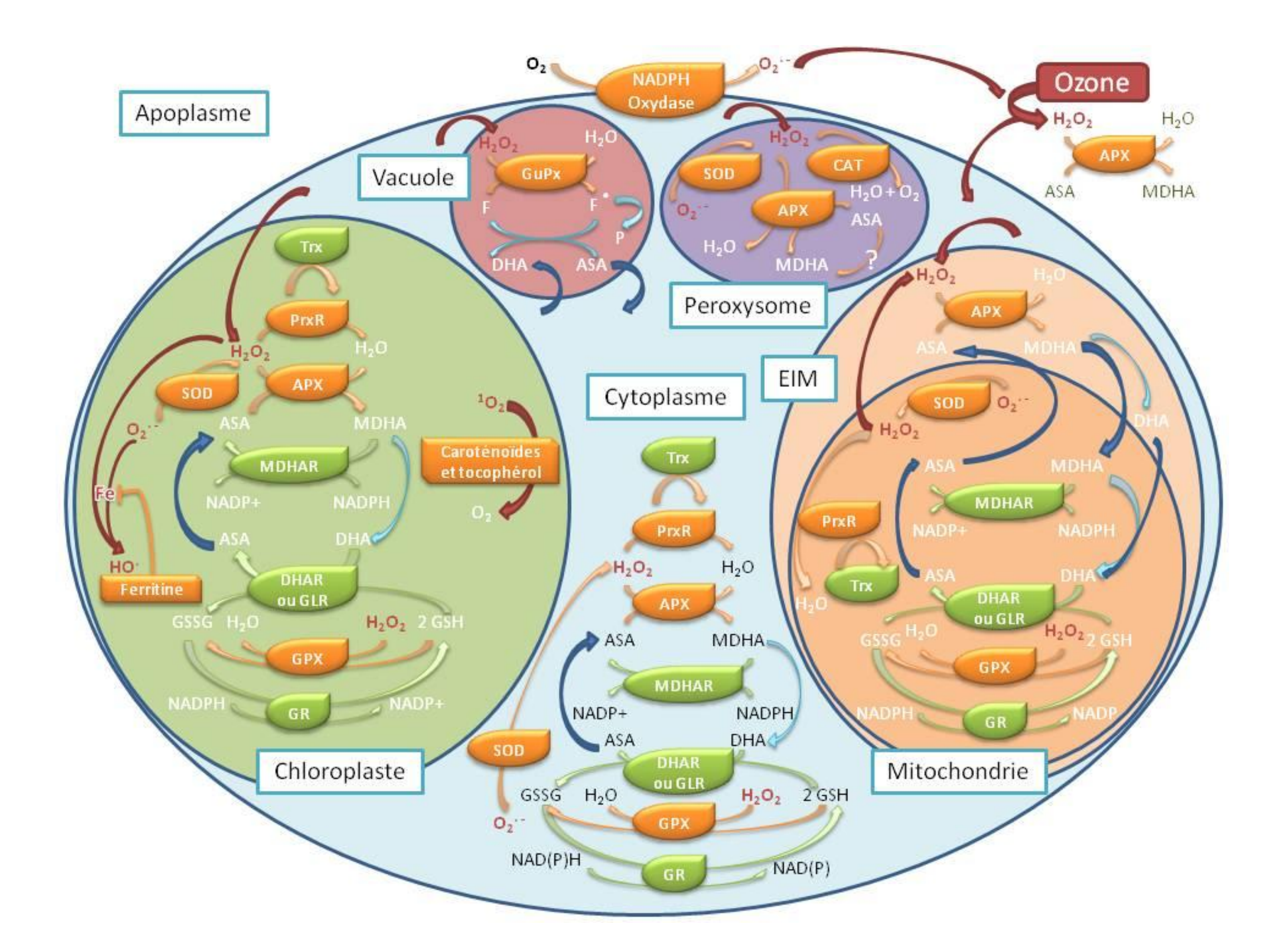


Figure 24 : Schéma des systèmes de détoxication des ROS dans les différents organites des cellules végétales. Abréviations : APX : Ascorbate peroxydase, ASA : Ascorbate, CAT : Catalase, DHA : Déhydroascorbate, DHAR : Déhydroascorbate réductase, EIM : Espace inter membranaire, F : Flavonoïde, F . : Radical Flavonoïde, GLR : Glutaredoxine, GPX : Glutathion peroxydase, GR : Glutathion réductase, GSH : Glutathion réduit, GSSG : Glutathion oxydé, GuPx : Guaiacol Peroxydase, MDHA : Monodéhydroascorbate, MDHAR : Monodéhydroascorbate réductase, NAD(P) : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé, NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit, P : Polymère, PrxR : Peroxiredoxine, SOD : Superoxyde dismutase ,Trx : Thioredoxine

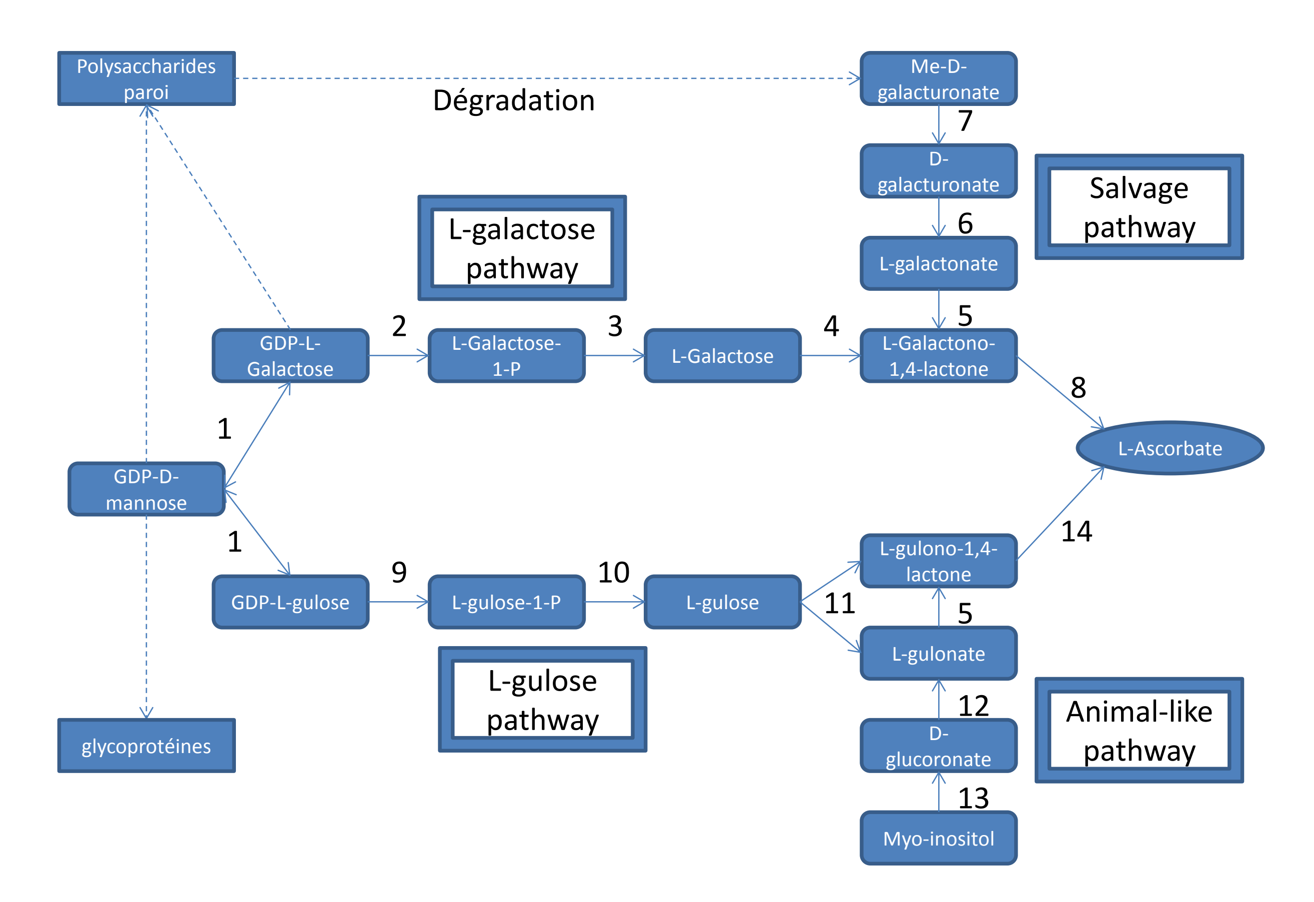


Figure 25 : Voies de synthèse de l'ascorbate 1: GDP-D-mannose 3',5'-epimerase (GME) → *GME*, 2: GDP-L-galactose phosphorylase → *VTC2/VTC5*, 3: L-galactose-1-P phosphatase → *VTC4*, 4: L-galactose dehydrogenase → *L-GalDH*, 5: aldonolactonase, 6: D-galacturonase reductase → *GalUR*, 7: methylesterase, 8: L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) → *GLDH*, 9: nucleotide pyrophosphatase ou sugar-1-P-guanylyltransferase, 10: sugar phosphatase, 11: sugar dehydrogenase, 12: uronate reductase, 13:myo-inositol oxygenase → *MIOX4*, 14: L-gulono-1,4-lactone déhydrogenase/oxydase

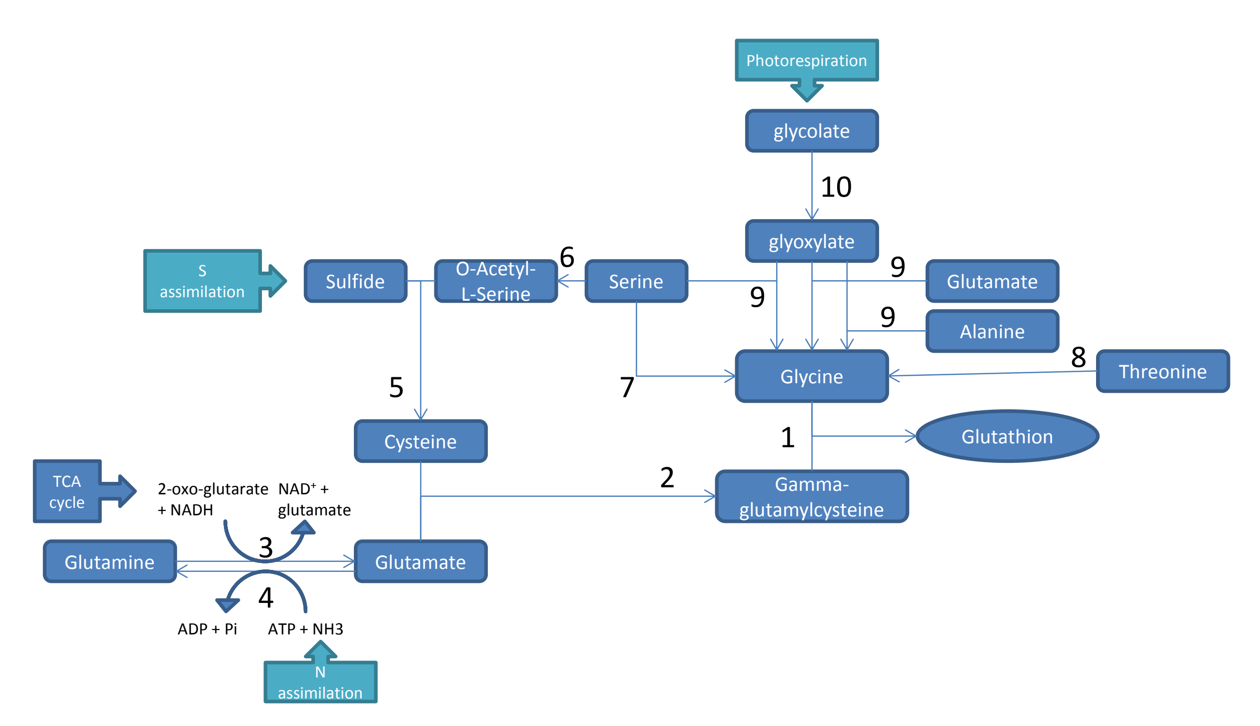


Figure 26 : Voie de biosynthèse du glutathion. 1: glutathione synthase (GSH2), 2 : gamma-glutamylcysteine synthase (GSH1), 3 : glutamate synthase NADH (GOGAT), 4 : Glutamine synthetase (GS), 5 : Cysteine synthase (OAS), 6 : Serine o-acétyltransferase (SATase), 7 : glycine hydroxymethyltransferase (glyA), 8 : threonine aldolase (THA), 9 : alanine – glyoxylate transaminase (AGT), 10 : glycolate oxydase

plus ou moins détaillées sont parfois décrites dans la littérature, mais sont pour certaines controversées. La GDP-L-galactose phosphorylase (VTC2) produit le premier métabolite dédié à la principale voie de biosynthèse de l'ascorbate, le L-galactose-1-P. C'est le point de régulation le plus important dans le contrôle transcriptionnel de la biosynthèse de l'ascorbate (Linster and Clarke, 2008).

5. VOIE DE BIOSYNTHESE DU GLUTATHION

Le glutathion est lui aussi un élément clé du mécanisme de détoxication des radicaux libres oxygénés puisqu'il sert à renouveler le pool d'ascorbate réduit dans la voie d'Halliwell-Asada. Le glutathion est un cofacteur de nombreuses enzymes impliquées dans la détoxication des ROS et joue donc un rôle central comme antioxydant mais aussi comme composant de la signalisation cellulaire. (Galant *et al.*, 2011; Noctor *et al.*, 2012). Sa voie de biosynthèse est très simple, car rapidement reliée aux acides aminés (Figure 26). Les deux principaux points de régulation sont la disponibilité en cystéine et l'activité de la gamma-glutamylcysteine synthétase (γ-ECS) (Noctor, 2006).

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Tableau 3 : Principaux indicateurs d'évaluation de l'impact de l'ozone sur la végétation

	Mesure	Paramètres	Unité
Danger	$[O_3]$ Ozone atmosphérique	AOT40 ou SUM60	ppb.h
Exposition	Entrée d'O_3 (g_s) Conductance stomatique	POD ou CUO ou $AF_{st}Y$ ($\sum$ flux O_3)	$mmol.m^{-2}$
Évaluation du risque	Flux effectif Conductance stomatique et indicateur de la détoxication	$\sum$ (flux O_3 – **Détoxication**)	$mmol.m^{-2}$

I. PROBLEMATIQUE

1. SEUILS DE RISQUE A L'OZONE

Les effets néfastes de l'ozone sur la santé, l'environnement et l'économie agricole et forestière représentent une préoccupation importante pour l'Union Européenne, qui exige une amélioration des seuils de risque à l'ozone pour la végétation. En effet, aujourd'hui l'impact de l'ozone est évalué à l'aide de plusieurs indicateurs (Tableau 3). Ces indicateurs, varient en fonction des paramètres de mesure utilisés et en fonction de leur précision. Un bon indicateur doit être le plus précis possible, tout en restant le plus simple d'utilisation, d'où certains compromis.

L'AOT40 (1), mesuré en ppb, a été développé et adopté au niveau européen dans les années 90's (Fuhrer *et al.*, 1997). Il correspond à l'exposition cumulée au delà d'une concentration limite de 40 ppb chaque jour (éclairements ≥ 50 $W.m^{-2}$) pendant la période de végétation. Il permet actuellement de définir des seuils critiques à ne pas dépasser. De mai à juillet, c'est l'indicateur d'exposition des cultures et d'avril à septembre, c'est l'indicateur d'exposition des forêts. Le SUM00 et le SUM60 (Sum of hourly ozone concentrations equaling or exceeding 0 and 60 ppb) sont aussi employés et correspondent à l'exposition cumulée sans ou au delà d'une concentration limite de 60 ppb.

(1) $$AOT40 = \sum_{i=1}^{n} max\left([O_3]_i - 40\,ppb; 0\right)\Delta t$$

L'$AF_{st}Y$ (Accumulated Stomatal Flux above a threshold of Y nmol $m^{-2}\,s^{-1}$) ou le POD_Y (Phytotoxic Ozone Dose above a threshold flux of Y nmol $m^{-2}\;\;s^{-1}$) (2), accepté en 2005 lors de la convention de Genève sur la pollution atmosphérique transfrontalière, sont plus représentatifs de l'impact de l'ozone sur la végétation car, étant basés sur le modèle de conductance stomatique multiplicatif de Jarvis (Jarvis, 1976), ils prennent en compte les conditions climatiques (influence de la température, du déficit de pression de vapeur d'eau (VPD), de la lumière, du potentiel hydrique du sol, de la concentration en ozone) et la phénologie des plantes. Ils simulent l'entrée d'ozone dans les feuilles et représentent le flux moyen horaire accumulé au-dessus d'un seuil Y par surface de feuille pendant la période de croissance de la plante.

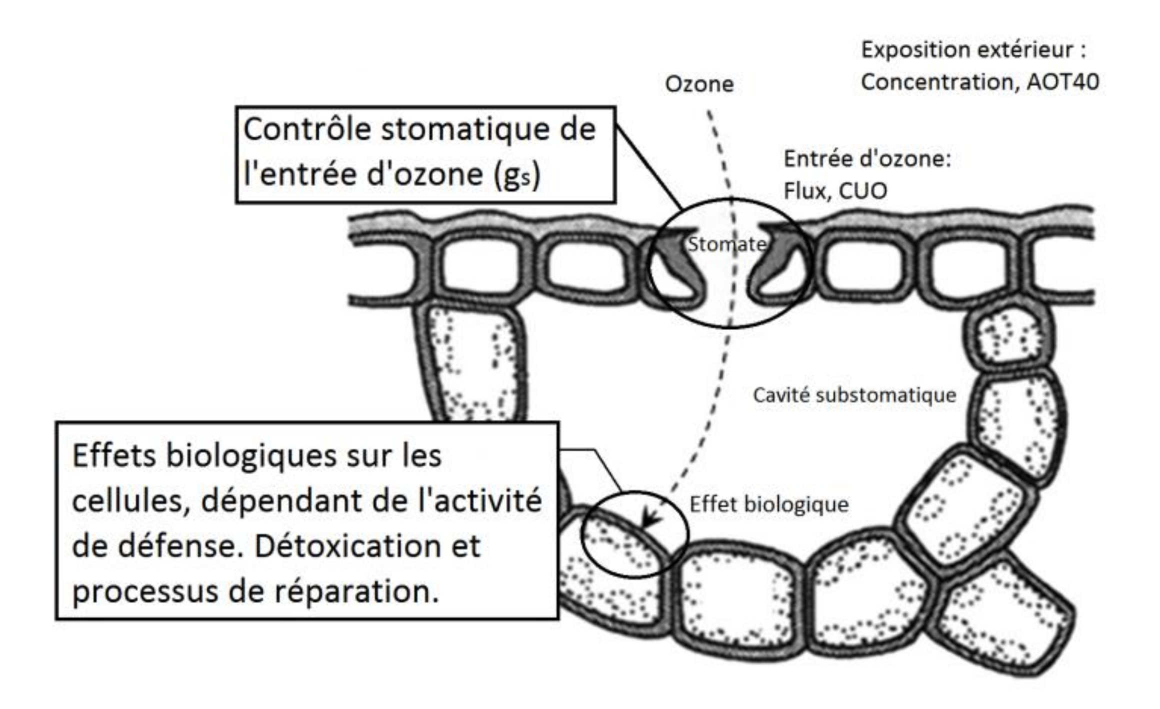


Figure 27 : Absorption d'ozone et effets biologiques (Tausz *et al*., 2007)

(2) $$POD_Y = \sum_{i=1}^{n} max(F_{st,i} - Y; 0)\,\Delta t$$

Fst représentant les flux d'ozone stomatique (nmol m^{-2} s^{-1})

En présence d'ozone, les plantes disposent de deux moyens de résistance : la régulation de la conductance stomatique pour limiter l'entrée d'ozone dans les feuilles et un système de détoxication complexe pour éliminer l'ozone et les ROS formés. L'évaluation des seuils de risque à l'ozone doit prendre en compte les différentes barrières et défenses des végétaux, et ne pas seulement tenir compte des concentrations en ozone extérieures (Karlsson *et al.*, 2007). Il reste maintenant à prendre en compte les aspects de détoxication des feuilles, en plus des flux entrants d'ozone, afin d'expliquer la variabilité inter et intra spécifique due à ces deux facteurs.

2. FLUX EFFECTIF D'OZONE

On peut utiliser la notion de "flux effectif d'ozone", balance entre les flux stomatiques et l'intensité de la détoxication cellulaire (Musselman *et al.*, 2006). Une chaîne de 3 ou 4 évènements est décrite suivant les auteurs (Dizengremel *et al.*, 2009; Tausz *et al.*, 2007) (Figure 27):

- concentration du polluant dans l'atmosphère (conditions environnementales).
- dépôt de l'ozone sur les surfaces (sols, feuilles) (exposition).
- degré d'intrusion de l'ozone dans les feuilles à travers les stomates (absorption).
- niveau d'antioxydants en réponse à la pression oxydative (effets biologiques).

L'$AF_{st}Y$ et le POD_Y prennent en compte la régulation des flux par la conductance stomatique en se basant sur le modèle multiplicatif de Jarvis. Or, ce modèle ne prend pas en compte l'impact direct de l'ozone sur ses différentes fonctions. Afin de calculer finement les flux effectifs d'ozone, il convient donc d'améliorer le calcul de la conductance stomatique pour prendre en compte l'impact direct de l'ozone sur la régulation des mouvements stomatiques aux différents paramètres environnementaux et de définir l'intensité de détoxication cellulaire.

II. OBJECTIFS

Cette thèse a pour but d'indiquer des pistes pour améliorer les seuils de risque à l'ozone. Mon travail comporte deux volets complémentaires visant d'une part à améliorer l'aspect détoxication à inclure dans les seuils de risques à l'ozone, et d'autre part, à prendre en compte dans les calculs de conductance stomatique l'impact de l'ozone sur la régulation stomatique. L'utilisation de trois génotypes de peupliers nous aide à comprendre les différences intra-spécifiques et à cibler des processus ou métabolites clés impliqués dans la sensibilité à l'ozone. Un suivi de traits écophysiologiques tels que le diamètre, la hauteur, les biomasses, le nombre de feuilles tombées, la conductance stomatique… nous permet de relier les autres résultats à une sensibilité à l'ozone.

Pour comprendre l'importance des processus de détoxication, des analyses métabolomiques (analyse de l'ascorbate, du glutathion, des caroténoïdes, des sucres…) ont été réalisées au niveau foliaire. Une approche génomique par PCR quantitative en temps réel, au niveau foliaire, complète les résultats en analysant l'expression de gènes impliqués dans les processus de détoxication. Ces résultats viennent enrichir nos connaissances pour identifier un indicateur du niveau de détoxication, ce qui permettra *in fine*, de calculer des flux effectifs. Parallèlement, afin d'améliorer le modèle de Jarvis permettant de calculer la conductance stomatique, nous avons caractérisé l'impact de l'ozone sur la réponse de la conductance stomatique à différents paramètres environnementaux (lumière bleue, lumière rouge, CO_2 et VPD). De plus, l'expression de gènes impliqués dans la régulation des mouvements stomatiques a été étudiée par qPCR sur des échantillons de stomates microdisséqués pour comprendre les mécanismes impactés par l'ozone.

MATERIEL ET METHODES

Tableau 4: Caractéristiques des 6 sections du genre Populus

			Critères de différentiation						
Section	**Aire d'origine**	**Principales espèces**	**Bourgeon**	**Feuille**	**Rameau**	**Bractée florale**	**Ecorce**	**Port**	**habitat**
Turanga	Eurasie Est et Afrique Nord	*euphratica* *ilicifolia* *pruniosa*	Jaune non collant	Unicolore. Dentelée		Etroite non ciliée	Crevassée	Seconde grandeur déjeté	Zone aride, supporte la salinité
Leucoides	Eurasie Est et Amérique du Nord	*glauca* *heterophylla* *lasiocarpa*	Brun peu collant	Bicolore. Crénelée	Circulaire	Large non ciliée	Crevassée	Houppier ample Feuillage brillant	Ornemental en Europe
Leuce or Populus	Eurasie, Afrique du Nord et Amérique du Nord	*alba* *guzmanantlensis* *monticola* *simaroa* *adenopoda* *gamblei* *grandidentata* *sieboldii* *tremula* *tremuloides*	Brun un peu collant	Bicolore. Crénelée, lobée ou lobulée	Circulaire	Large Ciliée	Lisse et claire Crevassée au pied	Grand développement	Peupliers forestiers
Aigeiros	Eurasie et Amérique du Nord	*deltoides* *fremontii* *nigra*	Rouge-Brun collant	Uni ou bicolore. Deltoïde ou rhomboïdale Crénelée.	Circulaire ou un peu anguleux	Large non ciliée	Rugueuse Sillonnée longitudinalement	Pyramidale port assez étroit, verticillé	Ligniculture Prairie Hors forêt
Tacamahaca	Eurasie Est, et Amérique du Nord	*augustifolia* *balsamifera* *cathayana* *ciliata* *koreana* *laurifolia* *maximowiczli* *simonii* *suaveolens* *szechuanica* *trichocarpa* *yunnanensis*	Rouge, Brun collant	Oblongue à ovale	anguleux	Large non ciliée	Lisse puis légèrement fissurée	Pyramidale port large, verticillé	Ligniculture Prairies et forêts dans son aire d'origine
Abaso	Mexique	*mexicana*							Forêt tropicale, Ornemental au Mexique

I. MATERIEL VEGETAL

1. GENERALITES SUR LE PEUPLIER

L'étude a été réalisée sur le peuplier, arbre modèle depuis 2002, grâce entre autre à sa croissance rapide et à son génome de taille modeste déjà séquencé (Brunner *et al*., 2004; Renaut *et al*., 2009). Il fait partie de la famille des salicacées (angiospermes dicotylédones) et est originaire de la zone tempérée de l'hémisphère nord. Le genre *Populus* comprend une trentaine d'espèces ainsi que de nombreux hydrides naturels ou créés par l'homme, classées en 6 sections botaniques (*Abaso, Aigeiros, Leucoides, Populus, Tacamahaca et Turanga*) sur la base de critères écologiques et morphologiques (Eckenwalder J. E., 1996; Dickmann et Kuzovkina, 2008) (Tableau 4). En France, trois espèces pures sont naturellement présentes, le peuplier noir (*P. nigra*), le peuplier tremble (*P. tremula*. L.) et le peuplier blanc (*P. alba*).

Le peuplier tient une place importante pour la foresterie française avec environ 200 000 ha de peupleraie (Tableau 5) et une production d'environ 1 400 000 m^3 de grumes de peuplier (Tableau 6). L'importance de la populiculture s'explique par la croissance rapide de l'essence (récolte en 15-20 ans) et par la propriété polyvalente du bois permettant son emploi dans des débouchés variés. Parmi ces utilisations on compte notamment les filières suivantes :

- Le déroulage : boîtes d'allumettes, emballages, panneaux contreplaqués…
- Le sciage : voligeage sous toitures, palettes, literie…
- Les panneaux dérivés : fibres, agglomérés…
- La pâte à papier
- Le bois-énergie (taillis à courte rotation ou à très courte rotation, TCR/TTCR)
- La construction

C'est aussi une essence de pleine lumière, très exigeante en eau et en éléments nutritifs. On le retrouve donc fréquemment en ripisylves et en fond de vallon. Afin d'avoir la meilleure production possible, différents cultivars (variétés obtenues en culture) sont utilisés en fonction des stations (sol + climat), de son comportement face aux maladies et au vent, de sa facilité de conduite, de ses qualités de bois. La majorité des plantations françaises sont

Tableau 5 : Les surfaces (en ha) de peuplier de production de bois, en France et par région.

Régions	Peupleraies en plein Source SCEES Teruti Lucas 2006	Peupleraies en plein Source Cadastre 2003
Alsace	2 000	2 176
Aquitaine	17 200	24 974
Auvergne	1 400	3 329
Basse Normandie	4 700	4 586
Bourgogne	11 900	14 442
Bretagne	6 100	8 235
Centre	22 600	22 814
Champagne-Ardenne	21 100	26 864
Corse	0	0
Franche-Comté	2 900	4 134
Haute Normandie	1 600	1 890
Ile de France	2 400	9 576
Languedoc-Roussillon	900	1 143
Limousin	900	329
Lorraine	3 600	3 540
Midi-Pyrénées	12 500	14 824
Nord Pas de Calais	9 000	12 863
Pays de la Loire	18 900	22 147
Picardie	23 900	32 108
Poitou-Charentes	13 000	12 177
Provence Alpes Côte d'azur	900	418
Rhône-Alpes	7 700	10 836
Total	**185 100**	**233 406**

Tableau 6: Récolte annuelle de grumes de peupliers (m^3)

Année	Déroulage	Sciage	Total
1988	1.271.267	1.594.960	2.866.227
1989	1.459.434	1.798.902	3.258.336
1990	1.543.139	1.865.680	3.408.819
1991	1.514.798	1.722.431	3.237.229
1992	1.331.655	1.525.557	2.857.212
1993	1.254.010	1.223.380	2.477.390
1994	1.381.740	1.216.459	2.598.199
1995	1.334.250	1.225.594	2.559.844
1996	1.246.355	1.075.937	2.322.292
1997	1.267.212	1.059.475	2.326.687
1998	1.239.646	991.653	2.221.299
1999	1.196.186	966.518	2.162.704
2000	1.125.856	821.908	1.947.764
2001	1.086.718	710.237	1.796.955
2002	943.446	536.793	1.480.239
2003	902.922	528.433	1.431.355
2004	872.668	443.402	1.316.070
2005	847.124	478.151	1.325.275
2006	862.145	531.006	1.393.151
2007	993.568	581.716	1.575.284
2008	914.245	508.278	1.422.523
2009	885.706	407.043	1.292.749



Figure 28 : Plantation des boutures de peuplier



Figure 29 : Début de l'acclimatation en phytotrons des peupliers âgés de 5 semaines

constituées de cultivars issus de croisements entre deux espèces nord-américaines (*P. deltoides* x *P. trichocarpa*, peuplier interaméricain) ou une espèce nord-américaine et une espèce eurasiatique (*P. deltoides* x *P. nigra*, peuplier euraméricain).

2. GENOTYPES UTILISES

Trois génotypes euraméricains (*Populus deltoides x Populus nigra*), Carpaccio, Cima et Robusta ont été sélectionnés dans l'équipe par des expériences antérieures pour leurs réponses contrastées à l'ozone (nécroses, chute de feuilles, conductance stomatique, activité PEPC, croissance...). Carpaccio apparait comme le génotype le plus tolérant, suivi de Cima, puis de Robusta qui est le génotype le plus sensible. Ce choix permet une meilleure compréhension des différents mécanismes utilisés en réponse à l'ozone et d'approcher les différences intra-spécifiques.

3. CONDITIONS DE CULTURE

Pour chaque expérience de fumigation, le matériel végétal a été cultivé dans les mêmes conditions. Les boutures de peuplier (issues de la pépinière forestière de Guéméné-Penfao) ont été plantées dans des pots de 5 L remplis de terreau (N/P/K 14/16/18, 1.2 $kg.m^{-3}$, Gramoflor SP1 Universel) 6 semaines avant le début de la fumigation d'ozone (Figure 28). Au fond des pots, 1 à 2 cm de billes d'argile de diamètre 8/16 permet d'améliorer le drainage de l'eau. De plus, 10 mg de nutricote T-100 (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France) ont été ajoutés pour fertiliser le milieu ce qui correspond à une dose finale de 20 mg/pot. Enfin, pour tamponner le pH, 1 $mg.l^{-1}$ de calcaire magnésium a été utilisé. Dans la chambre de culture, la température et l'humidité relative ont été maintenues à 23°C/75% le jour et 20°C/85% la nuit avec une photopériode de 14 h (8 h-22 h). Les arbres ont été irrigués manuellement tous les jours. Avant le transfert en phytotrons, 5 semaines après la plantation des boutures, une tige unique a été gardée, ils atteignaient alors entre 60 et 80 cm de hauteur (Figure 29). La fumigation a débuté après une semaine d'acclimatation dans les phytotrons.

4. PRELEVEMENT

Durant les périodes de fumigation, des prélèvements de feuilles ont été effectués, toujours à 15 h, pour le dosage des métabolites et l'étude de l'expression des gènes. Pour



Figure 30 : Restant d'une feuille de peuplier après les prélèvements pour la microscopie électronique

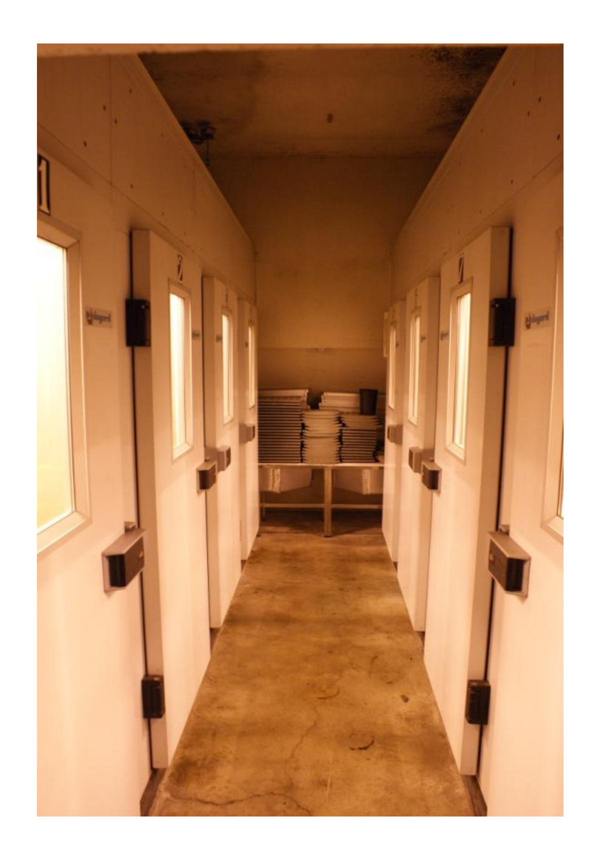


Figure 31 : Les Chambres phytotroniques (UMR1137, UL)



Figure 32 : Présentation d'une chambre phytotronique contenant 6 peupliers

réaliser ces prélèvements dans des conditions optimales, toutes les feuilles à prélever ont été identifiées avec de la ficelle dès la mise en phytotrons. Il s'agissait des deux premières feuilles matures en partant du haut (10ème et 11ème feuille). La nervure principale a été découpée aux ciseaux et les feuilles prélevées ont été immédiatement plongées dans des pochettes d'aluminium identifiées, et congelées dans de l'azote liquide. Une partie des échantillons, dédiée aux analyses métabolomiques (sauf ascorbate et glutathion) et à la micro-dissection laser, a été lyophilisée à -40°C pendant 40 h à une pression de 10 Pa dans un lyophilisateur FreeZone Plus freeze-dryer (Labconco, Kansas City, Missouri), puis la température a été remontée progressivement à 20°C en 10 h. Les autres échantillons ont été broyés dans l'azote liquide avant analyse.

Les échantillons utilisés pour la microscopie électronique ont été prélevés différemment (Figure 30). Un emporte-pièce nous a servi à prélever le matériel nécessaire à nos observations et analyses au microscope électronique à balayage (MEB) avant de le déposer dans un cryotube plongé immédiatement dans de l'azote liquide. Pour les échantillons dédiés à l'observation au microscope électronique à transmission (MET), un petit carré de 1 cm² a été découpé à la lame de rasoir et plongé dans un tube Eppendorf contenant du fixateur (voir Analyse ultrastructurale des cellules de garde (Microscopie Electronique à Transmission) pour la composition du fixateur).

II. FUMIGATION A L'OZONE

Les résultats présents dans cette thèse sont issus de mesures et de l'analyse d'échantillons prélevés au cours de deux expériences de fumigation distinctes.

1. PLAN D'EXPERIENCE

Lors de chacune des expérimentations de fumigation, 8 chambres ont été utilisées : 4 chambres 'témoin' et 4 chambres avec 120 ppb d'ozone (Figure 31). Lors de la première expérience, nous avons disposé 15 arbres par chambre, 5 de chaque génotype, puis nous avons sacrifié un arbre de chaque génotype dans chaque chambre, après 2 et 4 jours de fumigation, pour des mesures de biomasse, ne laissant à la fin que 9 arbres par chambre. Lors de la seconde expérience, nous n'avions mis que 6 arbres par chambre (Figure 32). L'expérience a été réalisée sur Carpaccio et Cima dans un premier temps, puis elle a été dupliquée sur Robusta.



Figure 33 : Exemple de racines de peuplier après lavage, prêtes pour le séchage

2. CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES

Les conditions environnementales dans les phytotrons sont similaires pour les deux expérimentations de fumigation afin de faciliter la synthèse des résultats. Pour les 4 chambres 'témoin', l'air est filtré à travers du charbon actif, tandis que pour les 4 chambres du traitement ozone, 120 ppb d'ozone ont été injectés de 9h à 22 h, directement dans l'air entrant dans les chambres. L'ozone a été produit à partir d'O_2 par deux générateurs d'ozone (OZ500; Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany). Les concentrations en ozone de chaque chambre ont été enregistrées sur ordinateur par un système automatique lié à un analyseur (O341M; Environnement S.A., Paris, France). La photopériode durait de 8 h à 22 h avec 5 lampes par chambre, le taux d'humidité relative était maintenu à 85% la nuit et à 75% le jour et la température était stabilisée à 20°C la nuit et 23°C le jour.

III. SUIVI DE CROISSANCE, BIOMASSES ET CHLOROPHYLLES

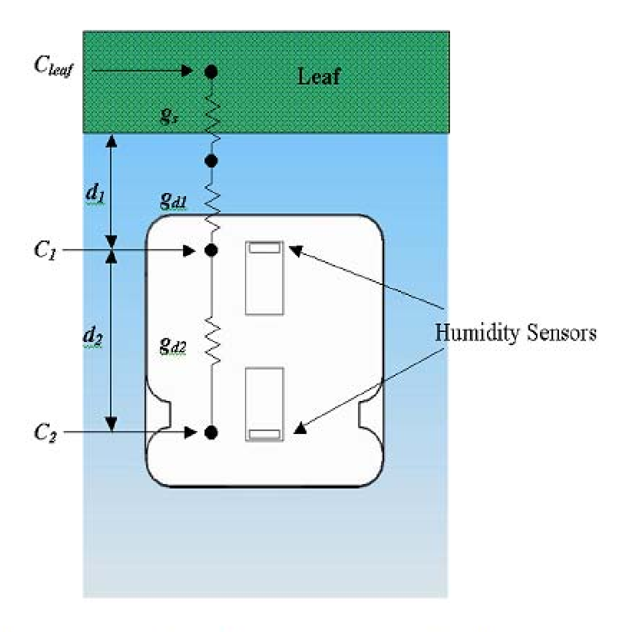
1. MESURES DE HAUTEUR, DE DIAMETRE ET CHUTES DE FEUILLES

Afin de réaliser un suivi de croissance, des mesures de hauteur et de diamètre à la base de la tige, ainsi que le décompte du nombre de feuilles et du nombre de feuilles tombées, ont été réalisées sur tous les arbres deux fois par semaine, à l'aide d'un mètre et d'un pied à coulisse.

2. MESURES DE BIOMASSES

Ces mesures permettent d'évaluer la croissance des plants et d'identifier s'il y eu une modification de l'allocation des ressources carbonées vers les parties aériennes ou souterraines.

Les arbres ont été découpés et les parties aériennes et souterraines ont été isolées. Les feuilles et les tiges ont été séparées dans des pochettes de papier avant d'être mises à sécher dans une étuve à 60°C jusqu'à stabilisation du poids, tandis que les racines ont nécessité préalablement au séchage, un lavage à l'eau afin de retirer toute la terre (Figure 33).



The parameters listed above represent the following:

C_{leaf}	The mole fraction of vapor inside the leaf
C_1	The mole fraction of vapor at node 1
C_2	The mole fraction of vapor at node 2
g_s	Stomatal conductance of the leaf surface
gd_1	Vapor conductance of the diffusion path between leaf surface and node 1
gd_2	Vapor conductance of the diffusion path between node 1 and node 2
d_1	Distance between the leaf surface and the first humidity sensor
d_2	Distance between the two humidity sensors

Figure 34: Schéma de principe du poromètre (issu du manuel d'utilisation)

3. MESURES DU CONTENU EN CHLOROPHYLLES

PRINCIPE DE L'APPAREIL

Les mesures en chlorophylles sont importantes car elles sont directement liées aux capacités photosynthétiques de la plante. Les mesures rapides au chlorophylle-mètre CCM-200 ont l'avantage de ne pas être destructives. L'absorbance optique est mesurée à deux longueurs d'onde différentes pour tenir compte de la transmission de la chlorophylle et de l'épaisseur de la feuille : 653 nm (chlorophylle) et 931 nm (près des infrarouges).

UTILISATION

Le contenu en chlorophylle de la première feuille mature a été suivi 2 fois par semaine grâce à un chlorophylle-mètre CCM-200 (Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Les valeurs obtenues (Chlorophyll Content Index, CCI) ont ensuite été converties en $g.m^{-2}$ grâce à la relation suivante (Bagard *et al*., 2008; Wellburn, 1994):

(1) $$[Chl] = 0.0214 \times (CCI) + 0.0424$$

IV. MESURES DES ECHANGES GAZEUX

1. CONDUCTANCE STOMATIQUE A LA VAPEUR D'EAU (POROMETRE SC1)

PRINCIPE DE L'APPAREIL

Le poromètre permet de mesurer la conductance stomatique des feuilles sur chacune des faces séparément. Pour réaliser ces mesures, la conductance de la feuille est mise en série avec deux éléments de conductance connue (Figure 34). La différence d'humidité mesurée entre les éléments permet d'obtenir le flux de vapeur d'eau. La conductance stomatique peut ensuite être calculée en se basant sur les hypothèses suivantes :

- l'humidité relative dans la feuille est égale à 1



Figure 35 : Mesure de la conductance stomatique sur la face adaxiale de la feuille réalisée à l'aide du poromètre SC1

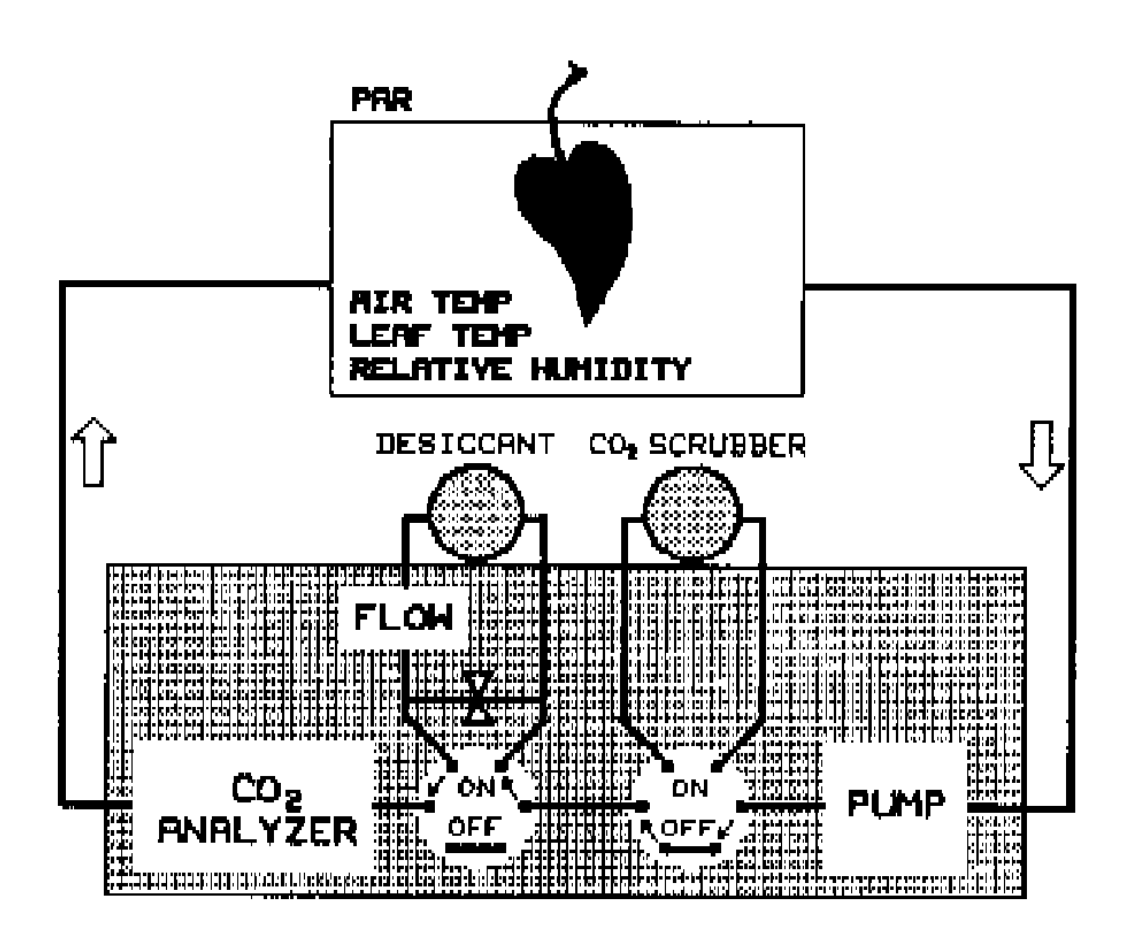


Figure 36: Schéma de fonctionnement de l'appareil Li-6200.

- toutes les valeurs de conductance sont en série, le flux est donc constant entre deux points
- la température de la feuille est égale à la température du premier capteur d'humidité

La conductance peut donc être exprimée comme une fonction des distances entre les capteurs d'humidité, de la température et des deux mesures d'humidité relative (2).

(2) $$g_s = \frac{\hat{\rho} D_{vapor}[h_{r1} e_s(T_{a1}) - h_{r2} e_s(T_{a2})]}{[e_s(T_{a1})(1-h_{r1})]d_2 - [h_{r1} e_s(T_{a1}) - h_{r2} e_s(T_{a2})]d_1}$$

avec $\hat{\rho}$ la densité molaire de l'air, D_{vapor} la diffusivité de la vapeur d'eau, hr l'humidité relative, $e_s(Ta)$ la pression de vapeur saturée à température ambiante, d1 la distance entre la feuille et le premier capteur et d2 la distance entre les deux capteurs.

UTILISATION

Lors de la seconde expérience de fumigation, un suivi de la conductance stomatique sur la face abaxiale et adaxiale de la première feuille mature de tous les arbres a été réalisé 3 fois par semaine, deux heures après le début de la photopériode, à l'aide d'un poromètre SC-1 (Decagon Devices, Pullman, USA) (Figure 35).

2. ASSIMILATION NETTE DE CO_2 ET CONDUCTANCE STOMATIQUE A LA VAPEUR D'EAU (LI-6200)

PRINCIPE DE L'APPAREIL

L'appareil Li-6200 est un système fermé portable de mesure de photosynthèse permettant de réaliser des mesures d'échanges gazeux (pas de distinction des faces). La feuille est placée dans une chambre laissant passer la lumière, dans laquelle sont mesurées la température de l'air et de la feuille, et l'humidité relative. Une pompe aspire l'air de la chambre pour le faire passer par un analyseur de CO_2, avant d'être réinjecté dans la chambre (Figure 36).



Figure 37 : Mesures réalisées à l'aide de l'appareil de mesure d'échanges gazeux Licor 6200

Lorsque la feuille respire, elle dégage du CO_2 et lorsqu'elle photosynthétise, elle consomme du CO_2. L'échange de CO_2 entre la feuille et l'atmosphère est calculé en mesurant le changement de concentration de CO_2 dans la chambre fermée contenant la feuille, dans un intervalle de temps court (30 s). L'assimilation nette de CO_2 est alors calculée en utilisant le taux de changement de CO_2 mesuré et d'autres facteurs, comme la surface de feuille enfermée, le volume de la chambre, la température et la pression atmosphérique.

Lorsque les stomates sont ouverts, la plante transpire entraînant une hausse de l'humidité de l'air dans le circuit fermé. L'utilisation de dessicant (perchlorate de magnésium) permet de maintenir une humidité constante (+/- 5%). Le taux de transpiration est calculé par le changement d'humidité dans le temps en tenant compte du flux d'air sec traversant le dessicant. Le taux de transpiration est alors utilisé avec la température de l'air et de la feuille et la conductance de couche limite connue dans la chambre, pour calculer la conductance stomatique grâce à la formule (3)

$$(3) \qquad g_{sw} = \frac{1}{\frac{e_s\langle T_l\rangle - e}{E\left(P - \frac{e_s\langle T_l\rangle + e}{2}\right)} - \frac{K^2+1}{g_{bwo}(K+1)^2}}$$

avec E la transpiration nette, T_l la température de feuille, e la pression de vapeur dans la chambre, g_{sw} la conductance à la vapeur d'eau, g_{bwo} la conductance de couche limite d'une face, e_s<> la fonction de pression de vapeur saturante, K le ratio stomatique, P la pression.

UTILISATION

Lors de chacune des deux expériences, un suivi de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_w) et de l'assimilation nette de CO_2 (face adaxiale et abaxiale confondue) a été réalisé avec le système de mesure d'échanges gazeux foliaires Li-6200 (LI-COR®Inc, Lincoln, NE, USA) (Figure 37), 3 fois par semaine, deux heures après le début de la photopériode. En combinaison avec le suivi horaire des concentrations en ozone dans chaque chambre, nous avons pu calculer l'AOT40 (4), le POD_Y (5) et le CUO (6). L'AOT40 (Accumulated Ozone over a threshold of 40 ppb) correspond à l'exposition horaire cumulée au delà d'une concentration limite de 40 ppb. Le CUO (Cumulative Uptake of Ozone) et le POD_Y (Phytotoxique Ozone Dose over a threshold of Y $nmol.m^{-2}.s^{-1}$) correspondent aux flux d'ozone horaires (F_{st}) (7) cumulés, de l'atmosphère à travers les stomates, au-delà ou non

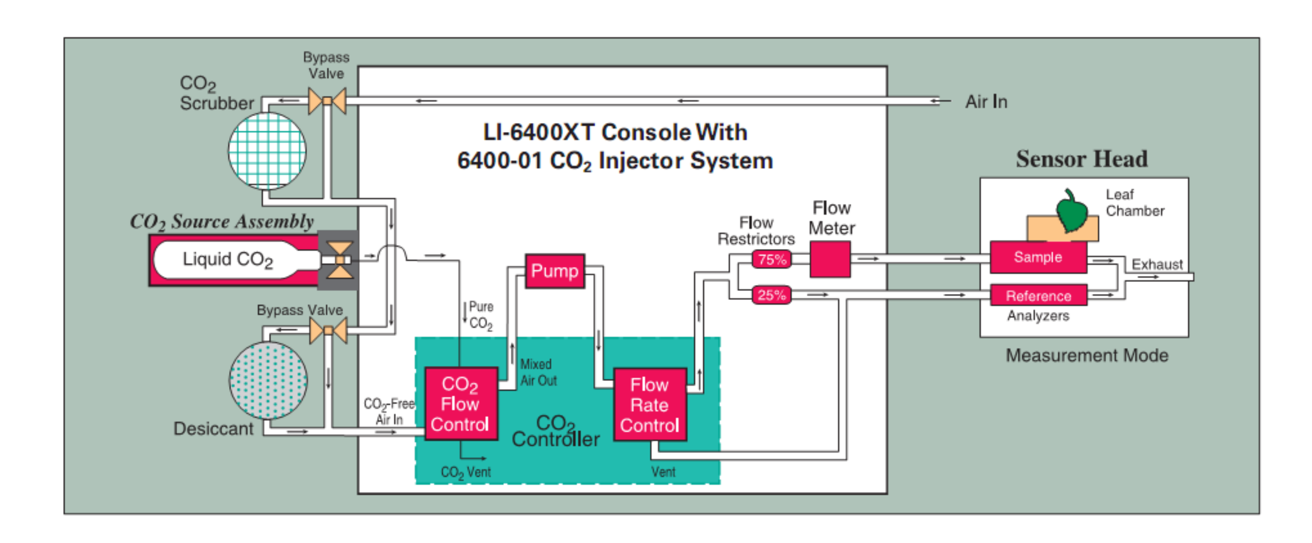


Figure 38: Schéma de fonctionnement de l'appareil Li-6400

d'un seuil de Y nmol.m^{-2}.s^{-1}. Comme recommandé par Fagerli *et al.* (2011), nous avons utilisé un seuil de 1 nmol.m^{-2}.s^{-1}.

(4) $$AOT40 = \sum_{i=1}^{n} \{max([O_3] - 40{,}0)\Delta t\}\, i$$

(5) $$POD_Y = \sum_{i=1}^{n} [max(F_{st} - Y, 0)\Delta t] i$$

(6) $$CUO = \sum_{i=1}^{n} (F_{st}\Delta t) i$$

(7) $$F_{st} = [O_3] \times g_s$$

avec n le nombre d'heures, Δt = 1h et Y = 1 nmol.m^{-2}.s^{-1}

Comme les conditions environnementales dans les phytotrons étaient stables, nous avons appliqué pour nos calculs de flux une conductance stomatique constante au cours de la journée. De plus, les valeurs de conductance stomatique des jours sans mesure ont été évaluées à partir des jours adjacents (Bagard *et al.*, 2008). Même si nous ne prenons pas en compte une éventuelle baisse de conductance au cours de la photopériode, nous appliquons le même principe pour tous les arbres.

3. ASSIMILATION NETTE DE CO_2 ET CONDUCTANCE STOMATIQUE A LA VAPEUR D'EAU (LI-6400)

PRINCIPE DE L'APPAREIL

L'appareil Li-6400 est un système ouvert portable de mesure de photosynthèse permettant de réaliser des mesures d'échanges gazeux (pas de distinction des faces). La feuille est placée dans une chambre dont les conditions lumineuses (intensité et qualité) sont contrôlées et dans laquelle l'air est renouvelé (circuit ouvert) (Figure 38). Les paramètres environnementaux sont contrôlés (température, VPD, CO_2, lumière). Les concentrations en H_2O et CO_2, le rayonnement quantique, la température de bloc, de l'air et de la feuille, le débit d'air et la pression sont mesurés de manière simultanée à l'aide de toute une série de capteurs majoritairement groupés au niveau de la chambre de mesure : un IRGA (analyseur de gaz à infrarouge) pour les concentrations d'H_2O et de CO_2, un capteur Quantum sensor Li 190 pour la lumière extérieure, un capteur GaAsP pour la lumière à l'intérieur de la chambre, une thermistance pour la température de bloc et d'air, un thermocouple pour la température de feuille, un capteur de flux pour le débit d'air (dans la console) et un capteur de pression (dans

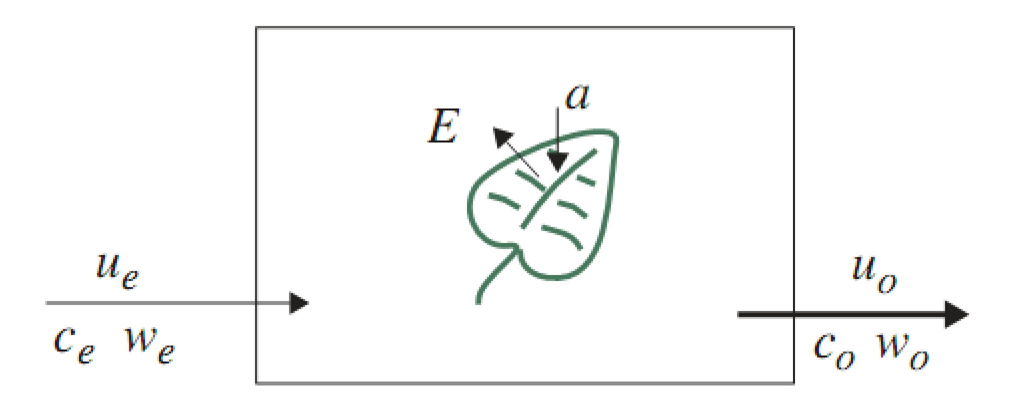


Figure 39: Paramètres mesurés utilisés dans le calcul de la transpiration et de la conductance stomatique

E transpiration nette, a assimilation, u_e *et* u_o *flux nets entrant et sortant,* w_e *et* w_o *concentrations en eau entrante et sortante,* c_e *et* c_o *concentration en* CO_2 *entrante et sortante.*

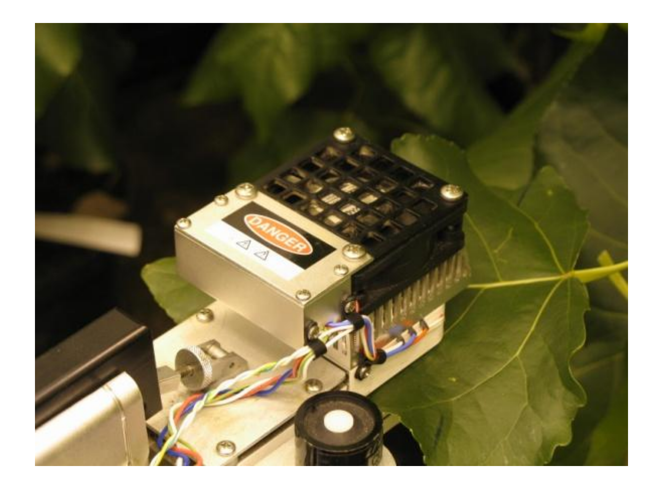


Figure 40 : Mesures réalisées à l'aide de l'appareil de mesure d'échanges gazeux Licor 6400

la console). La transpiration et la conductance stomatique sont ensuite calculées selon (8) et (9) en se basant sur des mesures faites sur un circuit de référence (air similaire à l'entrée de la chambre) en comparaison avec la sortie de la chambre (Figure 39).

(8) $$E = \frac{u_e(w_o - w_e)}{s(1 - w_o)}$$

(9) $$g_{sw} = \frac{1}{\frac{1}{g_{tw}} - \frac{k_f}{g_{bw}}}$$

avec E la transpiration nette, u_e le flux net, w_o et w_e les concentrations en eau entrante et sortante, s la surface, g_{sw} la conductance à la vapeur d'eau, g_{tw} la conductance totale de la feuille (calculée à partir de la pression de vapeur saturante à la température de la feuille et de l'air, la pression atmosphérique, et la transpiration), g_{bw} la conductance de couche limite et k_f facteur déduit du ratio stomatique.

UTILISATION

Lors de la première expérience de fumigation, des mesures de conductance stomatique à la vapeur d'eau et de photosynthèse (Asat) en condition de lumière saturante (1200 µmol m^{-2} s^{-1} de lumière (dont environ 10% de bleu et 90% de rouge), température foliaire à 25°C, concentration en CO_2 à 400 µmol.mol^{-1}, VPD à 0.9 kPa) ont été réalisées avec l'appareil de mesure d'échanges gazeux Li-6400 (LI-COR®Inc, Lincoln, NE, USA) aux temps t0, t14 et t18 (en jour), sur 1 arbre de chaque génotype dans chaque chambre (Figure 40).

Lors de la seconde expérience de fumigation, des mesures de conductance stomatique à la vapeur d'eau et de photosynthèse ont été réalisées à l'aide de 3 appareils Li-6400 (LI-COR®Inc, Lincoln, NE, USA) intercalibrés (Figure 41). Les mesures ont été réalisées sur 3 arbres par génotypes dédiés à ces mesures. Après avoir clampé la feuille, nous avons attendu la stabilisation de la conductance (g_{s0}), puis nous avons fait varier un seul paramètre environnemental, avant d'attendre qu'elle se stabilise de nouveau (g_{s1}). Nous avons ensuite calculé la vitesse de réponse (v) (10) grâce au temps nécessaire à la stabilisation de la conductance stomatique après variation d'un paramètre (t) (Figure 42).

(10) $$v = (g_{s1} - g_{s0})/t$$

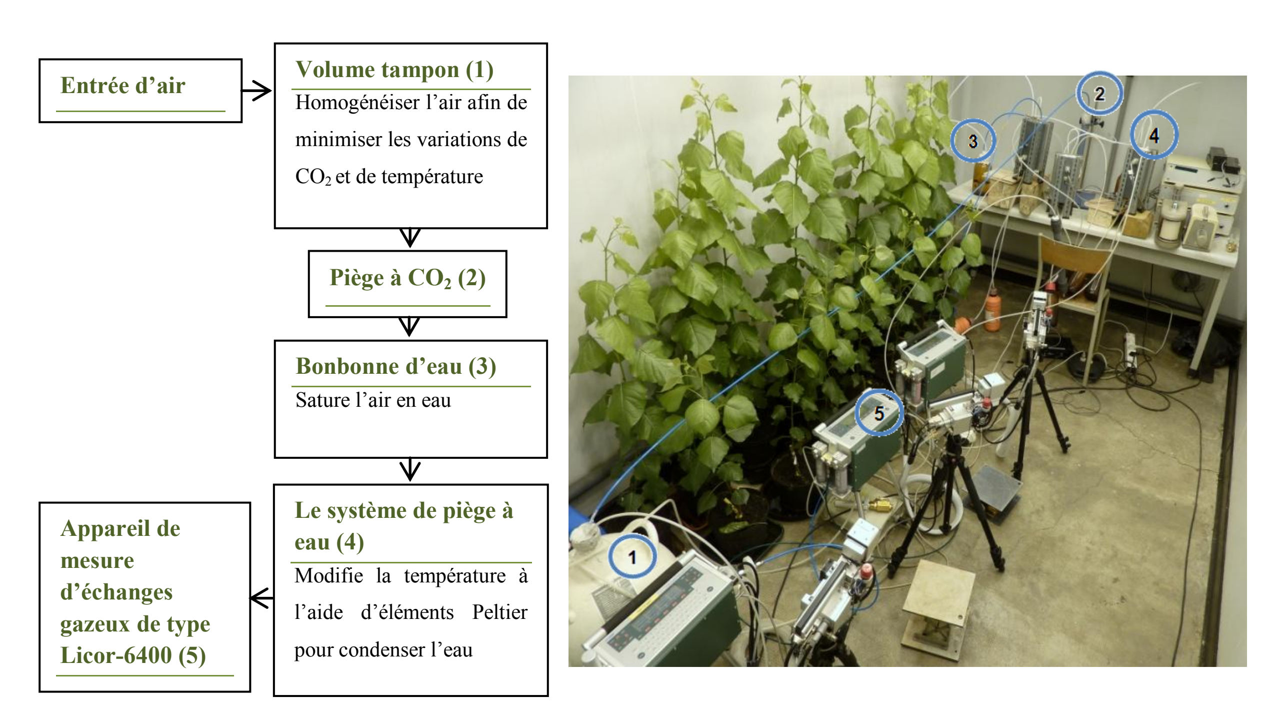


Figure 41 : Schéma du dispositif de mesure avec 3 appareils Li-6400 intercalibrés

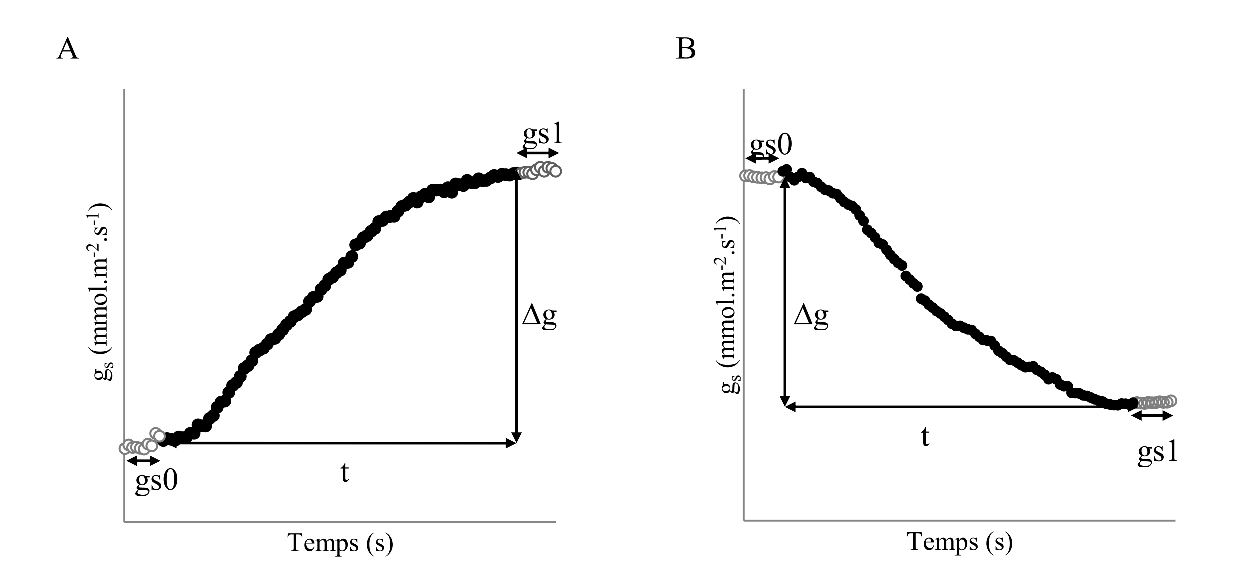


Figure 42 : Exemple de réponses de la conductance stomatique A) à une augmentation de lumière bleue et B) à une augmentation de VPD

Tableau 7 : Conditions environnementales avant et après variation d'un des paramètres à l'intérieur de la chambre de mesure de l'appareil Li-6400

Paramètres environnementaux	\Paramètre testé	Lumière bleue	Lumière rouge	VPD	CO_2
CO_2 (μmol CO_2. mol^{-1})	Initial	400 ± 2.0	400 ± 3.0	100 ± 1.0	400 ± 3.0
	Final	400 ± 2.0	400 ± 3.0	100 ± 1.0	1200 ± 3.0
Température (°C)	Initial	25 ± 0.3	25 ± 0.3	25 ± 0.3	25 ± 0.4
	Final	25 ± 0.3	25 ± 0.3	25 ± 0.3	25 ± 0.4
Lumière rouge/bleue ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)	Initial	0/0	200/30 ± 5.0	0/0	800/30 ± 5.0
	Final	0/30 ± 1	800/30 ± 5.0	0/0	800/30 ± 5.0
VPD (kPa)	Initial	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2
	Final	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	3.0 ± 0.3	0.8 ± 0.2



Figure 43 : Plateau robotisé de phénotypage enzymatique à haut débit

Chaque semaine, nous avons mesuré la réponse de la conductance stomatique et de la photosynthèse à une variation de lumière bleue, de lumière rouge, de concentration en CO_2 et de VPD, dans les conditions résumées dans le Tableau 7. Afin de s'affranchir des effets dus à la photosynthèse, la réponse à la lumière bleue a été mesurée dans l'obscurité, tout comme la réponse au VPD afin de permettre une fermeture des stomates plus rapide. Les mesures réalisées à l'obscurité étaient faite le matin pour que les arbres ne soient pas mis en présence de lumière avant la mesure, et les autres mesures étaient faites l'après-midi.

V. ANALYSES METABOLOMIQUES

1. PRINCIPES DES ANALYSES

Le COST Action FP0903 a financé une mission scientifique de 3 mois, me permettant de partir dans le laboratoire du Pr Elina Oksanen (University of Eastern Finland) à Joensuu, afin de procéder à des analyses métabolomiques sur les échantillons de feuilles entières. J'ai dosé les composés phénoliques, les caroténoïdes et les chlorophylles, qui jouent un rôle dans les processus de détoxication, ainsi que les acides aminés et les sucres, afin de voir si le métabolisme carboné est modifié par l'ozone. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et d'une chromatographie en phase gazeuse (GC) couplées à différents types de détecteurs. Ces outils de séparation analytique permettent de séparer les métabolites injectés dans la phase mobile (liquide ou gazeuse) en les faisant passer dans une phase stationnaire, en fonction de leurs propriétés chimiques et donc de leur affinité avec la phase stationnaire.

De plus, dans le cadre d'une collaboration avec le Plateau enzymatique de la plateforme Métabolome - Fluxome de l'INRA de Bordeaux sous la direction d'Yves Gibon, les formes réduite et oxydée de l'ascorbate et du glutathion ont été dosées en microplaques préparées à l'aide d'un robot de pipetage (Figure 43). Ces mesures spectrométriques se basent sur le suivi spectrométrique d'un composé coloré, qui apparait ou disparait en fonction d'une activité chimique dépendante de l'élément à mesurer.

2. ASCORBATE ET GLUTATHION

L'ascorbate et le glutathion ont été extraits à partir de 20 mg de poudre de feuille dans 400 µL d'acide métaphosphorique 5% à 4°C (Protocole détaillé en annexe 1). L'homogénat a

ensuite été centrifugé à 4°C pendant 10 min à 14000 g. L'ascorbate et le déhydroascorbate ont été mesurés à l'aide de la méthode décrite par Kampfenkel *et al.* (1995), adaptée à l'utilisation d'un robot de pipetage par le remplacement de l'acide trichloracétique par de l'acide métaphosphorique à 5%. La méthode est basée sur la réduction du Fe(III) en Fe(II) par l'ASA, et la réaction ultérieure des produits Fe(II) avec le 2,2 bipyridyl, pour former un complexe coloré dont on suit l'apparition à 550 nm. Pour doser l'ascorbate total, un traitement préalable avec l'agent réducteur Dithiothreitol (DTT) est nécessaire afin de réduire l'ascorbate oxydé. Pour le dosage du glutathion, nous avons suivi à 405 nm la réduction glutathion réductase-dépendante du 5,5'-dithiobis(2-nitro benzoic acid), avec ou sans prétraitement avec du 2-vinylpyridine (VPD), qui vient neutraliser la forme réduite du glutathion pour ne doser que la forme oxydée, selon la méthode décrite par Griffith (1980).

3. CAROTENOÏDES

Toutes les étapes, de l'extraction à l'analyse des échantillons, ont été réalisées en maintenant les échantillons à 4°C à l'obscurité, les caroténoïdes étant photosensibles (Protocole détaillé en annexe 2). Les caroténoïdes et les chlorophylles ont été extraits à partir de 10 mg de poudre de feuille lyophilisée dans 1 mL de méthanol, puis 1 mL d'hexane, contenant chacun 0.01% de butylhydroxytoluène (BHT). Les surnageants ont ensuite été séchés sous un flux de nitrogène par 400 µL, et redissouts dans des bouteilles opaques dans un mélange de 600 µL de dichlorométhane (DCM), 1200 µL d'acétonitrile (ACN) et 200 µL de méthanol (MeOH). Les analyses de chlorophylles et de caroténoïdes ont été réalisées par chromatographie liquide à haute performance -Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique - Spectromètre de masse (HPLC/APCI/MS)

4. COMPOSES PHENOLIQUES

Les extractions des échantillons ont été réalisées dans du méthanol 85% avec 0.005% de butylated hydroxytoluène (BHT) (Protocole détaillé en annexe 3). Durant l'extraction, 200 µL de solution de standard interne (la solution est faite à partir de 2 mL d'acide benzoic-d5 à 1 mg/mL dans un mélange 1:1 MeOH:H_2O, 2 mL de D-glucose-C13 à 1 mg/mL dans un mélange 1:1 MeOH:H_2O, 1 mL de biochanin A à 1 mg/mL dans du méthanol 100%, 600 µL de glycérol-d8 à 2.8 mg/mL dans un mélange 1:1 MeOH:H_2O et 1 mL d'alanine-d3 à 0.1 mg/mL dans un mélange 1:1 MeOH:H_2O) sont ajoutés. Les surnageants sont divisés en aliquots dédiés à différentes analyses. Un aliquot de 500 µL est séché et redilué dans 250 µL

de MeOH et 250 µl d'eau pour ensuite servir aux analyses de composés phénoliques. Nous avons analysé les composés phénoliques par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec ionisation par électronébulisation (ESI) équipé de détecteurs Photo Diode Array (Finnigan Surveyor PDA Detector), Corona Ultra à aérosol chargé (Esa Corona Ultra), et spectromètre de masse.

5. ACIDES AMINES

L'extraction des échantillons pour l'analyse des acides aminés est la même que pour les composés phénoliques (Protocole détaillé en annexe 3). Le même jour, un aliquot de 100 µL d'extrait a été préparé avec le kit EZ:FAAST (Phenomenex). Les prescriptions du fournisseur ont été suivies avec un ajustement du volume de réactif 1 à 50 µL au lieu de 100 µL. La procédure consiste en une extraction en phase solide, suivie d'une dérivatisation et d'une extraction liquide/liquide. L'analyse a été réalisée par chromatographie liquide haute performance, couplée à un spectromètre de masse (MS Finnigan LTQ detector) (HPLC/MS).

6. SUCRES

L'extraction des échantillons est la même que pour les composés phénoliques (Protocole détaillé en annexe 3). Un aliquot de 150 µL est complètement séché et stocké à -70°C, pour ensuite servir aux analyses des sucres. Les flacons, une fois sortis du congélateur, doivent rester 1h à température ambiante avant ouverture. Une solution de standard C8-C20 alcane est ajoutée (80 µL) et aussitôt évaporée. Pour la dérivatisation, nous ajoutons 80 µL de MAHC (20 mg/mL de méthoxyamine hydrochoride dans de la pyridine) et laissons 90 min à 37°C. Une autre étape de dérivatisation suit dans 80 µL de MSTFA (N-méthyle-N-(trimethylsilyl) trifluoro-acétamide), pendant 1 h à 37°C. Les échantillons sont ensuite transférés dans des inserts pour procéder à l'analyse. Les sucres, les alcools de sucres, les polyols et les acides phénoliques ont pu être analysés par chromatographie en phase gazeuse (Agilent Technologies 6890N Network GC system) couplée à un spectromètre de masse (Agilent 5973 Network détecteur sélectif de masse) (GC/MS) avec une injection à débit divisé.

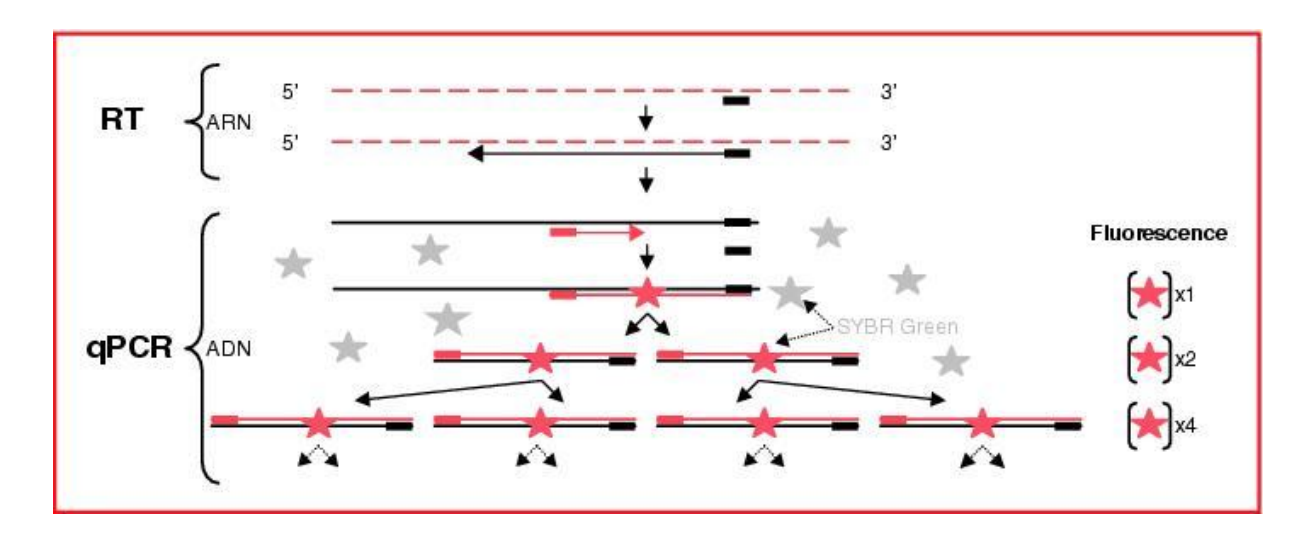


Figure 44 : Principe de la technique de RT-qPCR (méthode au fluorochrome SYBR Green). Dans une première étape, les ARN totaux (trait discontinu rouge) sont rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc, trait continu noir) par une transcriptase inverse, en présence d'une amorce spécifique antisens et d'oligos (dT). Dans une seconde étape, un petit fragment (100-200 nucléotides) de l'ADNc (trait continu rouge) est amplifié par PCR à l'aide d'une paire d'amorces sens et antisens spécifiques du gène à étudié, en présence de SYBR Green (étoiles grises). Ce produit devient fortement fluorescent (étoiles roses) lorsqu'il s'intercale dans un ADN double brin. À chaque cycle de PCR, le morceau d'ADN est amplifié et l'intensité de fluorescence est lue et enregistrée. Cela permet de quantifier le nombre de molécules d'ADN double brin, et par comparaison avec une gamme-étalon, d'en déduire la quantification absolue du nombre de molécules d'ADNc, et donc, d'ARN présent dans l'échantillon inconnu. (Gerlier *et al*., 2007)

VI. ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES

1. PRINCIPES DES ANALYSES

Des analyses transcriptomiques ont été réalisées sur des échantillons de feuilles fraîches broyées et aussi sur des stomates microdisséqués à partir de feuilles lyophilisées. Ces deux types d'échantillons nécessitent des traitements différents. Lors d'un stress comme l'ozone, l'expression de gènes peut être modifiée, c'est cette réponse que l'on mesure par les analyses transcriptomiques. Dans un premier temps les transcrits des gènes sont extraits (ARNs totaux) et ils sont rétrotranscrits en ADNc. Dans le cas des stomates microdisséqués, une amplification des ADNc est nécessaire pour obtenir un signal suffisant. Les mesures sont réalisées sur cet ADNc, par PCR quantitative (ou PCR en temps réel). C'est une méthode de réactions en chaîne par polymérase, permettant d'amplifier une portion d'ADN ciblée et de mesurer la quantité initiale d'ADN, grâce au suivi d'un marqueur fluorescent (Figure 44). Elle nécessite de dessiner des amorces (morceaux d'ADN simple brin) complémentaires et spécifiques de la séquence du gène à étudier.

2. ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES A PARTIR DE FEUILLES BROYEES

PREPARATION DES MATRICES

L'extraction des ARNs totaux a été réalisée à partir de 100 mg de poudre de feuilles fraîches, grâce au kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) selon le protocole du fabricant (Protocole détaillé en annexe 4). Un traitement à la Dnase I (Ambion) enlève l'ADN résiduel (Protocole détaillé en annexe 5). La qualité des ARNs ainsi obtenus est vérifiée par le système de gel d'électrophorèse automatisé Experion (Bio-Rad) (Protocole détaillé en annexe 6) et une quantification précise est permise grâce à une mesure au Quant-iT riboGreen (Invitrogen) (Protocole détaillé en annexe 7). La rétrotranscription a été réalisée sur 700 ng d'ARNs grâce au kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad), en contrôlant l'efficacité par l'ajout du kit Alien QRT-PCR Inhibitor Alert (Stratagene) suivant les recommandations du fabricant (Protocole détaillé en annexe 8).

DESSIN DES AMORCES

Toutes les cibles ont été identifiées dans la littérature sur *Arabidopsis thaliana*. Les homologues chez le peuplier ont ensuite été déterminés grâce à l'outil de bioinformatique phytozome V8.0 (Goodstein *et al.*, 2012), sur la base de blast de séquences protéiques et génomiques. Les gènes les plus proches des cibles chez le peuplier ont été étudiés. Des amorces ont été dessinées en se basant sur la version 2 du génome de *Populus trichocarpa* et sur les transcrits prédits par phytozome. Certaines règles ont été suivies pour le dessin des amorces :

- Taille des amorces égales à 20 ou 21 bases (b)
- Pourcentage de (G+C) compris entre 38 et 50%
- Les amorces doivent avoir le même T_m
- T_m égale à 58°C ou 60°C grâce à la formule $T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$
- Taille de l'amplicon (zone transcrite entre les amorces, additionnée à la taille de chacune des amorces) comprise entre 100 et 150 pb
- La séquence de l'amorce doit être au moins différente de 3 b par rapport à toute autre séquence dans le génome
- Les amorces ne doivent pas avoir plus de 4 nucléotides identiques consécutifs
- Dans les 5 derniers nucléotides de l'extrémité 3' il ne doit pas y avoir plus de 2 C ou G
- Les couples d'amorces doivent être vérifiés pour éviter la formation de dimère ou d'épingle à cheveux, grâce aux logiciels en ligne primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) et clustalw2 (Larkin *et al.,* 2007)
- Les amorces doivent être dessinées de préférence dans la seconde moitié du gène

Ont été choisis comme cibles, des gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse du glutathion et la principale voie de biosynthèse de l'ascorbate. La spécificité des couples d'amorces a été testée par PCR sur de l'ADNc de chacun des 3 génotypes étudiés,

ainsi que de la référence *trichocarpa*, suivie d'un dépôt et migration sur gel. La spécificité a ensuite été confirmée par séquençage de l'amplicon par l'entreprise Beckman coulter genomic.

PCR EN TEMPS REEL (QPCR)

La PCR en temps réel a été réalisée par le système Mx3000P QPCR (Agilent technologies) en suivant les recommandations du fabricant pour le programme (10 min 95°C, 40 cycles de 5 s à 95°C, et 20 s à 58 ou 60°C en fonction des amorces), suivie d'une courbe de dissociation pour vérifier la spécificité de l'amplification. Le MIX réactionnel contenait 10 µL de Brillant III Ultrafast SYBR green QPCR Master mix, 0.3 µL de ROX dilué au 500ème (Agilent Technologies), 250 nM d'amorces spécifiques et 2 µL de cDNA (dilué au 1/5), pour un volume total de 20 µL par puit. Des contrôles (NTC) ont été ajoutés à chaque plaque. Des gammes ont été réalisées en triplica pour chacun des gènes et chacun des génotypes. L'efficience de la PCR a ensuite été calculée grâce à elles, pour chaque gène et chaque génotype. Les valeurs de Ct ont été caractérisées pour un même seuil. L'expression des gènes a ensuite été normalisée grâce à 2 gènes de référence (alien et *UBL*) et deux gènes d'intérêt stables (*GOGAT6* et *VTC21*) déterminés par le logiciel GeneNorm.

3. ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES A PARTIR DE STOMATES MICRODISSEQUES

PREPARATION DES MATRICES

L'extraction des ARNs totaux a été réalisée à partir d'échantillons de 500 stomates microdisséqués, en suivant les instructions du fabricant avec le kit Qiagen Micro Plus (Qiagen). Les ARNs ont été par la suite retrotranscrits et les ADNc amplifiés en suivant les recommandations du fabricant avec le kit TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification (Sigma). Les ADNc ainsi obtenus ont ensuite été purifiés avec le kit QIAamp DNA Micro (Qiagen) et quantifiés par Nanodrop. Toutes les matrices ont été diluées pour atteindre une concentration de 5 ng/µL.

DESSIN DES AMORCES

Le dessin des amorces s'est fait de la même manière que décrit précédemment, mais pour des cibles différentes. Ont été choisis comme cibles, des gènes codant pour les canaux plasmiques ou vacuolaires des stomates, connus pour jouer un rôle dans les mouvements stomatiques, ainsi que les récepteurs de la lumière bleue (phytotropines) et du CO_2 (les anhydrases carboniques). La spécificité des couples d'amorces a été testée par qPCR sur de l'ADNc de chacun des 3 génotypes étudiés ainsi que par séquençage de l'amplicon par l'entreprise Beckman coulter genomic.

PCR EN TEMPS REEL (QPCR)

La PCR en temps réel a été réalisée par le système Mx3000P QPCR (Agilent technologies) en suivant les recommandations du fabricant pour le programme (10 min 95°C, 40 cycles de 5 s à 95°C, et 20 s à 58 ou 60°C en fonction des amorces), suivie d'une courbe de dissociation pour vérifier la spécificité de l'amplification. Le MIX réactionnel contenait 10 µL de Brillant III Ultrafast SYBR green QPCR Master mix, 0.3 µL de ROX dilué au 500ème (Agilent Technologies), 250 nM d'amorces spécifiques et 2.2 µL de cDNA (à 5 ng/µL), pour un volume total de 20 µL par puit. Des contrôles (NTC) ont été ajoutés à chaque plaque. Comme pour les qPCR réalisées sur les feuilles, des gammes ont été réalisées en triplicat pour chacun des gènes et chacun des génotypes. L'efficience de la PCR a ensuite été calculée grâce à elles pour chaque gène et chaque génotype. Les valeurs de Ct ont été caractérisées pour un même seuil. L'expression des gènes a ensuite été normalisée grâce à 2 gènes de référence (*GOGAT6* et *UBL*) et trois gènes d'intérêt stable (*OST26*, *KAT3* et *GLR2*) déterminés par le logiciel GeneNorm.

VII. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE

1. PREPARATION D'ECHANTILLONS DE STOMATES MICRODISSEQUES

Les techniques de microdissection laser permettent d'isoler les stomates pour ensuite réaliser des mesures sur des échantillons de stomates purs. Afin de microdisséquer ces derniers, il convient d'isoler l'épiderme des feuilles lyophilisées. Ne pouvant détacher

l'épiderme simplement, des morceaux d'épiderme sont décrochés par grattage de la surface de la feuille avec une lame de rasoir, au dessus d'une lame de verre. Les fragments d'épiderme sont fixés à la lame par l'ajout et l'évaporation de quelques gouttes d'éthanol. Les cellules de garde sont alors découpées par microdissection laser et catapultées dans un tube Eppendorf, grâce au système PALM MicroBeam (Zeiss) (Figure 45 A et B). Les stomates se retrouvent isolés dans le tube Eppendorf tandis que sur la lame, il ne reste que des morceaux d'épiderme (Figure 45 C et D).

2. DETERMINATION DE LA DENSITE STOMATIQUE ET DE LA TAILLE DES STOMATES (MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE)

PRINCIPE DE L'APPAREIL

Le Microscope Electronique à Balayage (MEB) permet d'obtenir des images en haute résolution du relief de la surface d'un échantillon. Un faisceau d'électrons vient balayer la surface de l'échantillon qui va alors émettre des particules (électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, rayons X…) (Figure 46) qui sont collectées par des détecteurs. Les informations collectées par les détecteurs d'électrons permettent alors de reconstruire une image en trois dimensions et ceux collectant les rayons X permettent de déterminer la composition minérale de l'échantillon. En effet, les énergies des rayons X émis sont spécifiques des éléments minéraux constituant l'échantillon.

UTILISATION

Trois échantillons de feuilles par arbre, prélevés à l'emporte pièce, ont été lyophilisés. Ils ont ensuite été découpés en deux et déposés sur portoirs, de manière à avoir un demi-disque laissant voir la face supérieure et l'autre la face inférieure de la feuille. Les portoirs ont ensuite été rendus conducteurs aux électrons par dépôt d'une couche de carbone (pulvérisation cathodique). Des observations au MEB ont permis de déterminer, grâce à l'utilisation du détecteur d'électrons rétrodiffusés (BSD), la densité stomatique de chaque génotype pour chaque traitement sur chaque face de la feuille. Les observations ont été faites avec les réglages suivants : tension d'accélération des électrons (EHT) = 15 kV, Intensité de Sonde (ISonde) = 1 nA, distance focale (WD) = 12 mm, grandissement = 250X. La taille des

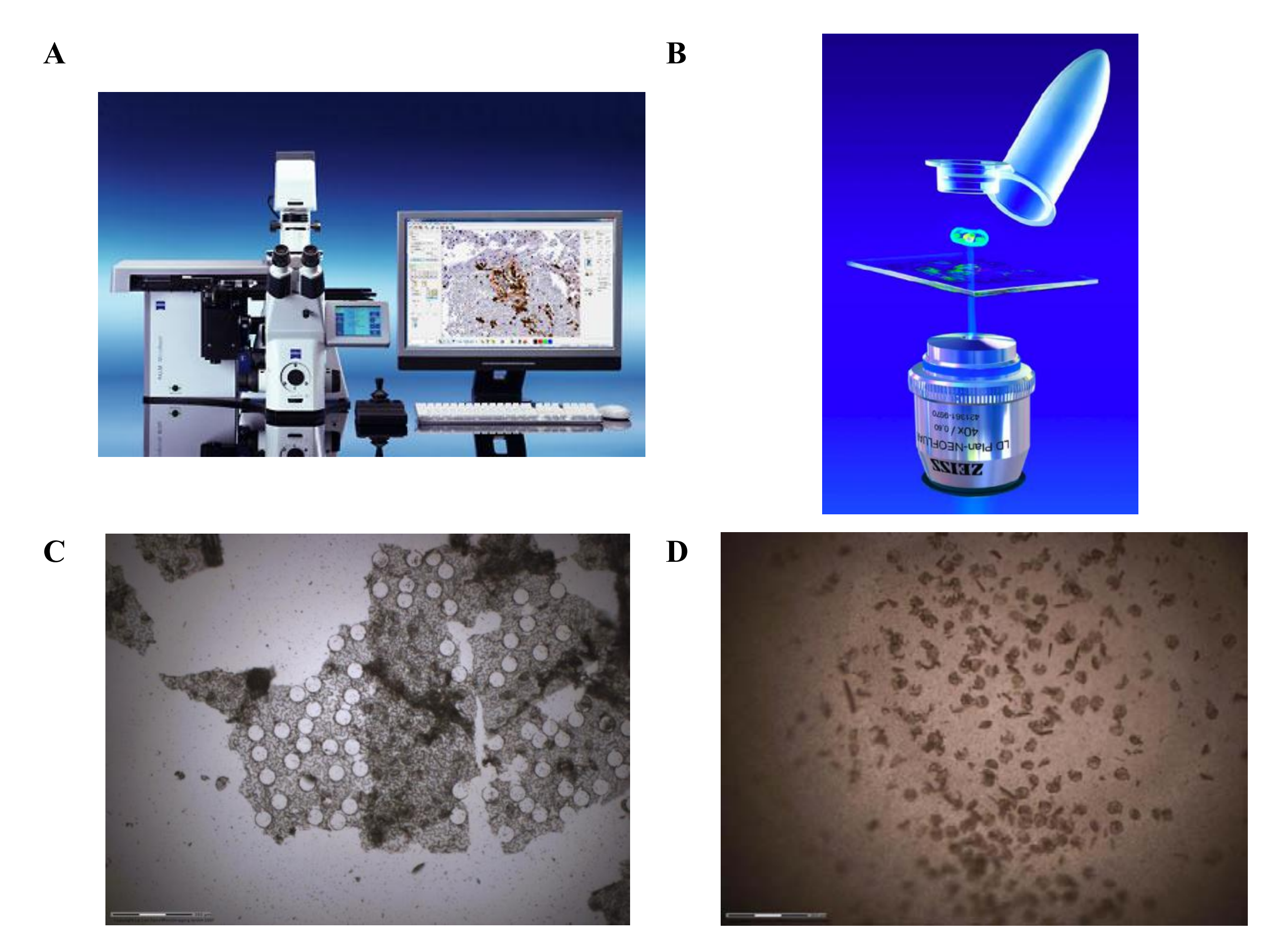


Figure 45 : (A) Système de microdissection laser Palm Microbeam (Zeiss), (B) Principe de fonctionnement du système de microdissection laser, (C) Morceaux d'épiderme restant sur la lame après microdissection, (D) Stomates propulsés dans le tube Eppendorf

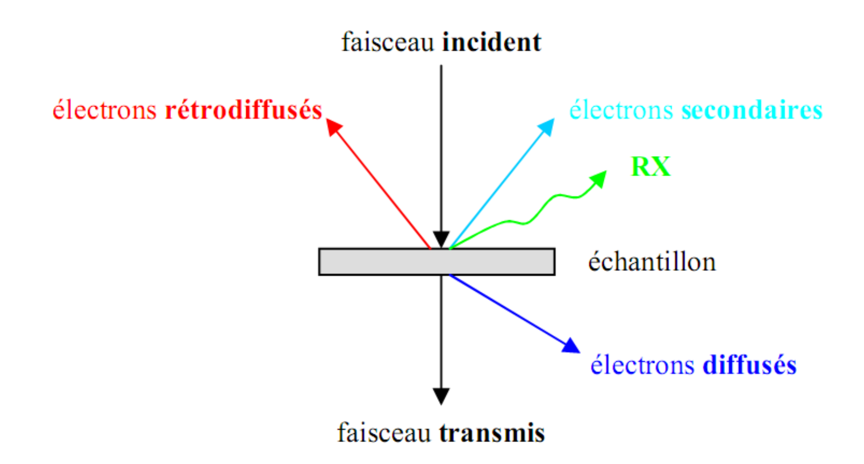


Figure 46 : Schéma des interactions entre le faisceau d'électrons et la matière

stomates a été mesurée dans les même conditions, mais à un grandissement de 800X. Chaque demi-disque a donné lieu à 3 répétitions sur 3 champs différents, pour l'observation de la densité stomatique et à un champ permettant d'observer 6 stomates, pour les mesures de taille.

3. MICROANALYSE X DES ELEMENTS MINERAUX (MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE)

La microanalyse des rayons X a permis de doser les concentrations minérales à l'intérieur des cellules de garde. Les analyses ont été réalisées sur les mêmes échantillons que ceux ayant servis pour l'observation au MEB, avec 2 champs de 5 stomates par demi-disque. Les µanalyses X ont été accomplies grâce à un spectromètre à dispersion d'énergie (EDS) avec les réglages suivants : EHT = 15 kV, ISonde = 800 pA, WD = 15 mm, grandissement = 1000X. De plus, toutes les deux heures et au début et à la fin de chaque portoir analysé, une recalibration de l'énergie des spectres avec un standard manganèse était effectuée.

4. ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DES CELLULES DE GARDE (MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION)

PRINCIPE DE L'APPAREIL

Le Microscope Electronique à Transmission (MET) permet de visualiser des objets de taille inférieure à une cellule avec une haute résolution et donc d'étudier les structures cellulaires. Un faisceau d'électrons à haute tension, focalisé à l'aide de lentilles électromagnétiques, traverse un échantillon très mince (10 à 100 nm). Les électrons vont alors réagir avec les atomes de l'échantillon (Figure 46). En MET, seuls les électrons traversant l'échantillon sont analysés. La distinction entre les électrons transmis (n'ayant pas interagit avec l'échantillon) et les électrons diffusés (résultant de l'interaction avec l'échantillon) permet de recréer les images.

UTILISATION

Des observations au MET de coupes tangentielles ultrafines (100 nm) de feuilles incluses en résine (Protocole détaillé en annexe 9), ont permis d'étudier l'ultrastructure des stomates et d'apprécier l'état et la présence d'organites, tels que les chloroplastes et les mitochondries. Les observations ont été produites à 80 kV sur un MET PHILIPS CM12.

RESULTATS

I. REGULATION STOMATIQUE

1. EFFETS DE L'OZONE SUR LA REPONSE STOMATIQUE AUX PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX (LUMIERE BLEUE, LUMIERE ROUGE, CO_2 ET DEFICIT DE PRESSION DE VAPEUR D'EAU) DANS TROIS GENOTYPES DE *POPULUS DELTOIDES X NIGRA*

Les stomates régulent les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère, et plus particulièrement, la transpiration et l'entrée de CO_2. La conductance stomatique varie en fonction des conditions environnementales, les stomates étant ouverts quant les conditions sont les plus favorables. La lumière (bleue et rouge) induit une ouverture stomatique, tandis qu'une augmentation de VPD et de CO_2 entraîne une fermeture stomatique. La vitesse de réaction des stomates permet, dans un environnement en constante variation, de saisir les meilleures opportunités pour limiter l'évapotranspiration tout en assimilant un maximum de carbone. De plus, la régulation de la conductance stomatique joue un rôle important pour limiter les flux entrants d'ozone et ainsi le stress oxydatif induit par celui-ci. Cependant, il a été montré que la réponse des stomates aux facteurs environnementaux est altérée sous l'effet de l'ozone, avec des vitesses ralenties (Paoletti, 2005; Paoletti and Grulke, 2010).

L'objet de l'étude présentée ci-après était de caractériser précisément l'effet de l'ozone sur la réponse des stomates aux variations de lumière bleue, de lumière rouge, de CO_2 et de VPD, chez trois génotypes de peuplier variant en tolérance (basée sur des mesures de croissance, de biomasse et de nécroses). Elle a permis de mettre en avant les résultats suivants :

- l'ozone entraîne une baisse de la conductance stomatique, de l'assimilation nette de CO_2, des teneurs en chlorophylles et une perte de biomasse.
- l'ozone provoque un ralentissement de l'ouverture des stomates lors d'une augmentation de l'intensité de lumière bleue.

- l'ozone conduit à un ralentissement de la fermeture des stomates lors d'une augmentation de la concentration en CO_2 ou d'une hausse du VPD.
- l'ozone induit une baisse de l'amplitude de l'ouverture des stomates lors d'une augmentation de l'intensité de lumière rouge.
- le génotype le plus sensible (Robusta) est caractérisé par des vitesses de réponse plus lentes et par des conductances stomatiques initiales plus importantes.

Ces résultats ont été publiés dans le journal Environmental Pollution (2013) 173 : 85-96.

Environmental Pollution 173 (2013) 85–96



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol



Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO_2 and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* × *Populus nigra* genotypes

Jennifer Dumont [a,b,c], Fabien Spicher [a,b,c,1,2], Pierre Montpied [a,b,c], Pierre Dizengremel [a,b,c], Yves Jolivet [a,b,c], Didier Le Thiec [a,b,c,*]

[a] *INRA, UMR 1137, Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Champenoux F-54280, France*
[b] *Université de Lorraine, UMR 1137, Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France*
[c] *IFR110 EFABA, Vandoeuvre–lès–Nancy F–54500, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 July 2012
Received in revised form
17 September 2012
Accepted 28 September 2012

Keywords:
Ozone
Stomatal conductance
Light
CO_2 concentration
VPD

ABSTRACT

The effect of ozone (O_3) on stomatal regulation was studied in three Euramerican poplar genotypes (*Populus deltoides* × *Populus nigra*: Carpaccio, Cima and Robusta). The impact of O_3 on stomatal conductance responses to variations in blue light, red light, CO_2 concentration and vapour pressure deficit (VPD) was studied. Upon O_3 exposure, a sluggish response of stomatal movements was observed, characterized by slower reactions to increases in blue light intensity, CO_2 concentration and VPD, and lower amplitude of the response to variations in light intensity. That sluggish response should be taken into account in stomatal conductance models for phytotoxic ozone dose (POD_Y) calculations. The speed of the response to variations in environmental parameters appears as a determining factor of genotype-related sensitivity.

1. Introduction

Tropospheric ozone (O_3) is a powerful greenhouse gas which acts as a phytotoxin (IPCC, 2007). Its toxicity results in oxidative stress in plants. The concentration of tropospheric O_3 is currently still rising while there are already impacts on vegetation and ecosystems (Sitch et al., 2007; Vingarzan, 2004). Annual O_3 concentrations are increasing, but they are not homogeneous at a global scale. Between 2008 and 2009, maximum O_3 concentration decreased by 1–2 nmol mol^{-1} in the south of Europe, whereas in France and Belgium it increased by 2–4 nmol mol^{-1} of O_3 (Fagerli et al., 2011). Currently, in France, O_3 concentrations exceed 120 nmol mol^{-1} several days a year, depending on the area (ASPA, 2010 and MEDDTL, 2010). Such concentrations might be more frequent in the future. O_3 stress leads to physiological (Ainsworth et al., 2012; Matyssek et al., 2010 in beech), biochemical (Dizengremel, 2001; Renaut et al., 2009 in poplar and Wittig et al., 2009), and molecular effects (Castagna and Ranieri, 2009; Heath, 2008; Kangasjärvi et al., 1994). This causes substantial declines in agriculture and forestry productivity linked to economic losses (Avnery et al., 2011; Felzer et al., 2007; Van Dingenen et al., 2009). Differences in O_3 sensitivity between tree species, and even within species between genotypes, are observed (Betzelberger et al., 2010; Hayes et al., 2007). Sensitivity depends on the two defence mechanisms set up by plants, i.e. regulation of stomatal conductance and detoxification of the reactive oxygen species generated during O_3 degradation (Brosché et al., 2010; Dizengremel et al., 2008).

As the present situation is becoming worrying, it is urgent to improve the accuracy of the exposure indices used to assess O_3 risk. Critical level indicators, based only on atmospheric O_3 concentrations, as AOT40 (Accumulated Ozone over a Threshold of 40 μg^{-1} m^{-3} h^{-1}) and SUM60 (sum of all hourly average concentrations over 60 nmol mol^{-1}) were previously used because they were easy to calculate but inaccurate (Fuhrer et al., 1997; Gerosa et al., 2009; Karlsson et al., 2007). They were progressively replaced by indicators of the O_3 uptake through stomata: CUO

* Corresponding author.
E-mail addresses: jdumont@nancy.inra.fr (J. Dumont), fabien.spicher@agroparistech.fr (F. Spicher), montpied@nancy.inra.fr (P. Montpied), pierre.dizengremel@univ-lorraine.fr (P. Dizengremel), yves.jolivet@univ-lorraine.fr (Y. Jolivet), lethiec@nancy.inra.fr (D. Le Thiec).
[1] Present address: INRA, UMR 1092, Laboratoire d'étude des ressources forêt-bois, Champenoux F-54280, France.
[2] Present address: AgroParisTech – ENGREF, UMR 1092, Laboratoire d'étude des ressources forêt-bois, Nancy F-54042, France.

0269-7491/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.09.026

(Cumulative Uptake of Ozone) or $AF_{st}Y$ (Accumulated stomatal flux above a threshold of Y nmol m^{-2} s^{-1}) recently renamed POD_Y (Phytotoxic Ozone Dose over a threshold of Y nmol m^{-2} s^{-1}). This latter indicator takes into account the O_3 flux by modelling O_3 stomatal conductance with models such as the DO3SE model (Büker et al., 2012; Emberson et al., 2000) which computes stomatal conductance using the additive algorithm of Jarvis (1976). That model calculates conductance with a maximum conductance value and reducing functions that depend on phenology and environmental factors such as irradiance, Vapour Pressure Deficit (VPD), temperature and soil water potential. Nevertheless, it does not integrate the effect of O_3 on those factors although O_3 is known to impair stomatal functioning (Fagerli et al., 2011). Danielsson et al. (2003) and Pleijel et al. (2002) added the effect of O_3 to the phenology function in potato and wheat. That new function is being increasingly used, but more knowledge is needed to determine if the effects of O_3 on trees should really be integrated in the same way because no attempt has been made to link the O_3 function to another function than phenology so far.

Stomatal movements are due to the regulation of guard cell turgor via the control of osmolyte concentrations in their cytosol (Pandey et al., 2007). Stomata react to changes in environmental parameters by opening or closing. O_3 has been shown to have different effects on stomatal movements: it modifies opening and/or closing speed, but also opening and/or closing rate in response to variations in light intensity (Hoshika et al., 2012; Paoletti, 2004; Paoletti and Grulke, 2010), VPD (Grulke et al., 2007), soil moisture (Hayes et al., 2012), CO_2 concentration (Onandia et al., 2011) and ABA concentration (Mills et al., 2009).

The purpose of this study was to characterize the impact of O_3 on the stomatal responses to four major environmental parameters, i.e. blue light, red light, CO_2 concentration and VPD, on three Euramerican poplar genotypes. The stomatal opening by light consists of two components, the red light response driven by photosynthesis and the specific-blue light response which is photosynthesis-independent (Shimazaki et al., 2007; Wang et al., 2011). We tested these components separately by studying blue light in darkness. We focused on the speed and the amplitude of stomatal responses while studying the link with net CO_2 assimilation. The regulation of stomatal conductance and thereby the regulation of stomatal uptake can be involved in the characterization of O_3 sensitivity. We hypothesized that the difference in O_3 sensitivity could also be linked to different stomatal behaviours in response to variations in environmental parameters under O_3 treatment. In this context, we also monitored the global impact of O_3 on biomass, growth, chlorophyll content, photosynthesis, and stomatal conductance by gas exchange measurements. All our results were linked to POD_1 to determine if other parameters than biomass could be modelled as a linear regression in relation with POD_1, or if other types of adjustments are necessary.

2. Material and methods

2.1. Plant culture and exposure conditions

Cuttings of three Euramerican poplar genotypes (*Populus deltoides* × *Populus nigra*: 'Carpaccio', 'Cima' and 'Robusta') with similar stomatal densities were selected from a previous study on the basis of contrasting responses to O_3 (i.e. visible injury, growth, number of fallen leaves…, data not shown) and planted in 5-L pots filled with loam (N/P/K 14/16/18, 1.2 kg m^{-3}, Gramoflor SPI Universel), fertilized by adding 20 mg of slow-release nutritive granules (Nutricot T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France). One mg L^{-1} of magnesian limestone was added to regulate the pH. The experiment was first conducted for 3 weeks on Carpaccio and Cima, and was later duplicated on Robusta with half of the chambers. The plants were grown in growth chambers for 5 weeks at 75/85% relative humidity (day/night) with a 14-h light period (250 μmol m^{-2} s^{-1} PPFD at mid-leaf height from 08 h00 to 22 h00) and a temperature of 23/20 °C. Twenty-nine individuals of each genotype were distributed in 8 phytotronic chambers with growth conditions identical to those in the growth chamber, half of which were set for O_3 treatment (120 nmol mol^{-1} for 13 h). At the end of a 7-day long acclimation period, the O_3 treatment started while control trees were exposed to charcoal-filtered air for 18 days. O_3 was produced from pure O_2 with two ozone generators (OZ500; Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and injected directly in the chambers 1 h after the beginning of the photoperiod until its end. A set of analysers (O341M; Environment S.A., Paris, France) was used to monitor O_3 concentrations.

2.2. Plant growth and biomass

Before fumigation, five plants of each genotype were cut to measure initial biomass. At the end of the experiment, all the plants were harvested, divided into stems, leaves, and roots and oven-dried (60 °C) until constant weight was reached, and then weighed. Diameter at collar (*D*) and height (*H*) were recorded twice a week until the end of the experiment on each individual.

2.3. Total chlorophyll content

Total chlorophyll content was measured twice a week using a CCM-200 chlorophyll meter (Opti-Sciences, Hudson, NH, USA) on the first fully-expanded mature leaf at the beginning of the experiment (11th for Cima and Robusta and 15th for Carpaccio, the age of leaves being the same between genotypes). The values obtained from the CCM (Chlorophyll Content Index, CCI) were converted to g m^{-2} thanks to a known relation (Bagard et al., 2008; Wellburn, 1994):

$$[\mathrm{chl}] = 0.0214(\mathrm{CCI}) + 0.0424$$

2.4. CUO and POD_1 calculations

CUO and POD_Y with a threshold of 1 nmol m^{-2} s^{-1}, recommended by Fagerli et al. (2011), are modelled as the flux of O_3 from the atmosphere through stomata (F_{st}; [nmol m^{-2} s^{-1}]). POD_1 and CUO are calculated from hourly values of $F_{st.}$

$$\mathrm{POD_Y} = \sum_{i=1}^{n}[\max(F_{st} - Y, 0)\Delta t]i \quad (1)$$

$$\mathrm{CUO} = \sum_{i=1}^{n}(F_{st}\Delta t)i \quad (2)$$

n being the number of hours and $\Delta t = 1$ h, $Y = 1$ nmol m^{-2} s^{-1}

The O_3 flux was estimated based on the measurements of stomatal conductance to O_3 (g_{O_3}), which is related to stomatal conductance to water vapour (g_s) by the following formula: $g_{O_3} = g_s/1.51$ (Massman, 1998). g_w measurements were performed three times a week. As our experiment was conducted in phytotronic chambers where environmental conditions were stable, we applied a constant value of g_w all day long. When g_s measurements were not available, we estimated them from the values of the flanking days (Bagard et al., 2008).

2.5. Gas exchange measurements

Gas exchange (A, net CO_2 assimilation and g_w, stomatal conductance to water vapour) was monitored using a portable photosynthesis system (Li-6200, LiCor, Lincoln, NE, USA) in phytotronic environmental conditions. Measurements were carried out 3 times a week, 2 h after lights were switched on, on the first fully-expanded mature leaf at the beginning of the experiment.

Gas exchange responses to varying blue light, red light, leaf-to-air vapour pressure deficit (VPD) and CO_2 were measured once a week, on three plants of each genotype for each treatment, on the leaf below the one used for Li-6200 measurements (the 12th for Cima and Robusta and the 16th for Carpaccio, the age of leaves being the same between genotypes), with three intercalibrated open gas exchange systems with 6400-40 Leaf Chamber Fluorometer (Li-6400, LiCor Lincoln, NE, USA) coupled with a custom-built water trap. Data were recorded automatically every 30 s. For each test, only one environmental parameter was changed, as summarized in Table 1. Leaf temperature was 25 °C for all conditions. Blue light and VPD responses were studied in complete darkness in order to bypass the effects of photosynthesis and in case of VPD response to allow the control of leaf temperature. Red light response was studied in presence of blue light and CO_2 response was studied at saturating light conditions in order to have a complete aperture of stomata. We used 400 μmol CO_2 mol^{-1} for red light, blue light and CO_2 responses in order to keep the CO_2 concentration used in phytotronic chambers. To study VPD responses we used 100 μmol CO_2 mol^{-1} to open stomata even in the dark.

For calculating closing or opening speeds, we used, as shown in Fig. 1:

- Stomatal conductance at the initial state g_s0 (means of 10 measurements after reaching a steady state, before changing environmental parameters)
- Stomatal conductance at the final state g_s1 (means of the last 10 measurements after reaching a steady state, after changing environmental parameters)

Table 1
Environmental conditions at the initial state and at the final state inside the Li-6400 chamber.

Environmental parameters	Parameter studied	Blue light	Red light	VPD	CO_2
CO_2 (μmol CO_2 mol^{-1})	Initial	400 ± 2.0	400 ± 3.0	100 ± 1.0	400 ± 3.0
	Final	400 ± 2.0	400 ± 3.0	100 ± 1.0	1200 ± 3.0
Temperature (°C)	Initial	25 ± 0.3	25 ± 0.3	25 ± 0.3	25 ± 0.4
	Final	25 ± 0.3	25 ± 0.3	25 ± 0.3	25 ± 0.4
Red (630 nm)/blue light (470 nm) (μmol m^{-2} s^{-1})	Initial	0/0	200/30 ± 5.0	0/0	800/30 ± 5.0
	Final	0/30 ± 1	800/30 ± 5.0	0/0	800/30 ± 5.0
VPD (kPa)	Initial	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2
	Final	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	3.0 ± 0.3	0.8 ± 0.2

- The evolution of stomatal conductance between the two states: $\Delta g_s = g_s1 - g_s0$
- The time taken for stomata to close (for CO_2 and VPD) or to open (for red or blue light), *T*.

Finally, we calculated closing or opening speed values, $v = \Delta g_s/T$.

2.6. Statistical analyses

The data obtained from Li-6400 measurements were fitted with a linear mixed effect model, with individuals as random variables, and genotype, treatment and time as fixed variables. To cope with heteroscedasticity, variances were modelled as different for each genotype. Contrast analyses were performed to test for treatment effect at each time-point for each genotype, genotype effect at each time-point on ambient values, and the genotype × treatment interaction at each time-point. All the biomass data were fitted with a linear model, with treatment and genotype as factors. Contrast analyses were performed to test for genotype effect before fumigation and treatment effect for each genotype. Other data were modelled as linear time-dependent responses so that the responses before fumigation (time = 0), i.e. intercepts, were identical within each genotype, and slopes depended on genotype and treatment factors and their interaction. These models were fitted as linear mixed effect models with individuals as random variables. Normality and homoscedasticity of standardized residuals were graphically checked using quantile-to-quantile and residual-*vs*-predicted plots. An ANOVA was used to test the differences between genotypes on initial values before fumigation and treatment effect and genotype × treatment interaction on slopes. In case of an interaction, contrast analyses were performed to test for treatment effect on slopes within each genotype. Data were analysed using R 2.14.2 (R Development Core Team, 2012) and the nlme (Pinheiro et al., 2012) and multcomp (Hothorn et al., 2008) packages. Effects were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of ozone on growth and biomass

Height and stem diameter appeared to be significantly higher ($p < 0.001$) in Carpaccio than in the other two genotypes, especially in Robusta which was the smallest (Fig. 2). During the experiments, we observed a similar increase in height and diameter for the three genotypes in the absence of O_3 treatment. O_3 treatment had no significant effect on those parameters in Cima and Robusta, but in Carpaccio height significantly increased by 9% and diameter decreased by 10%.

The significant effects of O_3 on Carpaccio height (Fig. 3**A**) and diameter (Fig. 3**B**) as related to POD_1 were modelled by linear regression, which explained a high percentage of the variance, 94% and 97% respectively, but a polynomial regression of order 2 was found to fit better for height (98% of the variance explained).

Carpaccio had also significantly more leaves than the other two genotypes (Table 2). O_3 exposure significantly decreased the number of leaves produced during the experimentation by all genotypes, with 13%, 10% and 14% loss for Carpaccio, Cima and Robusta, respectively. In parallel, O_3 increased leaf fall significantly in Carpaccio (10 times more) and Robusta (8 times more), and non significantly in Cima (4 times more). Regarding biomass, and in accordance with previous results, Carpaccio had a significantly higher stem biomass than the other genotypes (1.7 times more than Cima and 2.6 times more than Robusta) and a significantly higher leaf biomass than Cima (1.3 times more). The only significant effect of O_3 on biomass was a 35% decrease of the root biomass of Carpaccio. These results lead to a significantly higher root-shoot ratio in Robusta (twice as much) than in the other genotypes. O_3 treatment had no significant effect on that ratio, even though a decrease in the ratio was observed for Carpaccio. Although the effect of O_3 on total biomass was not significant, we observed a trend for a decrease in total biomass values in all three genotypes (5% in Carpaccio and Robusta and 12% in Cima).

3.2. Effects of ozone on chlorophyll content, net CO_2 assimilation and stomatal conductance

Robusta differed significantly from the other two genotypes, with higher chlorophyll content (about 1.5 times more) (Fig. 4**C**). An

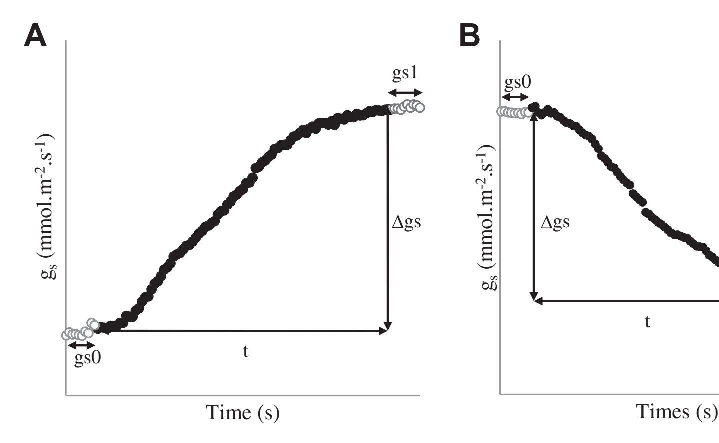


Fig. 1. Examples of **A** light curve (stomatal opening) and **B** VPD or CO_2 curve (stomatal closure) showing the parameters used for calculations, i.e. g_s0 stomatal conductance before changing environmental parameters, g_s1 stomatal conductance at equilibrium after changing environmental parameters, *t* the time needed to reach equilibrium, Δg_s the difference between g_s0 and g_s1.

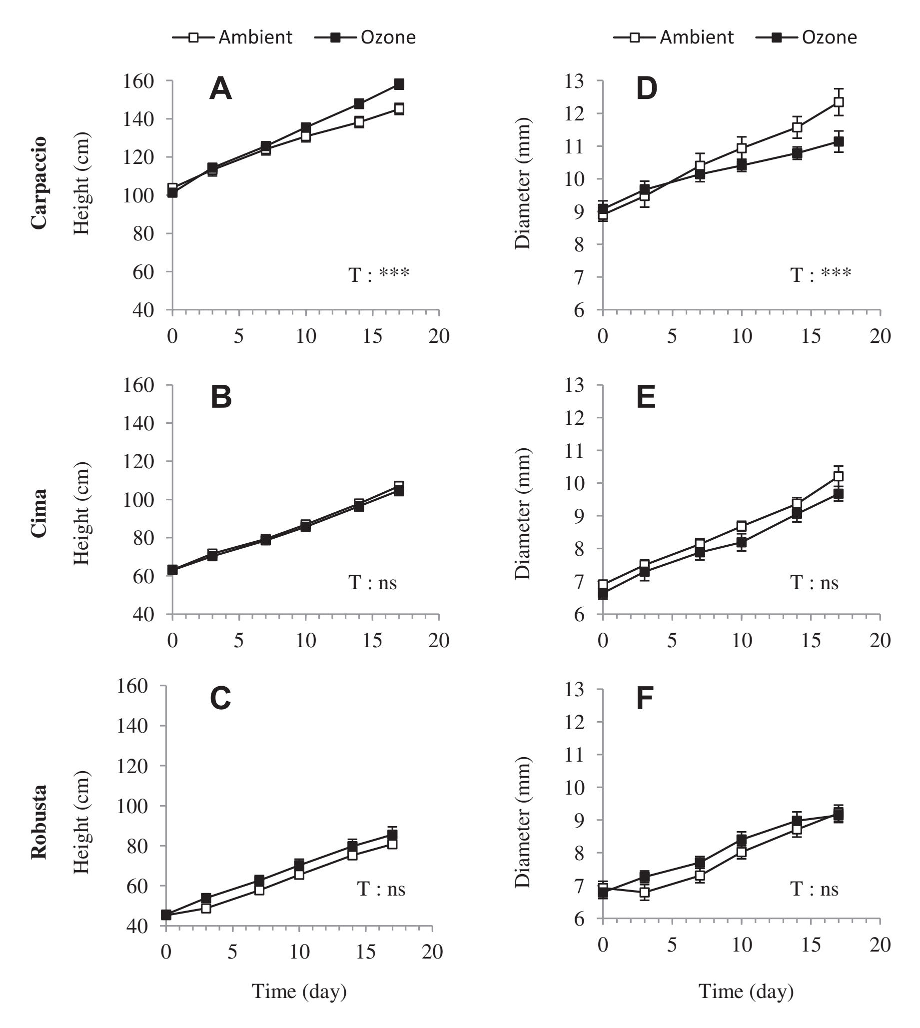


Fig. 2. Effects of O_3 treatment (■Ozone □Ambient) on height (cm) (**A**, **B** and **C**) and stem diameter (mm) (**D**, **E** and **F**) of Carpaccio (**A** and **D**), Cima (**B** and **E**) and Robusta (**C** and **F**) ns = no significant effect, and significant differences between treatments (*T*) are indicated by * ($p < 0.05$) ** ($p < 0.01$) or *** ($p < 0.001$).

important effect of O_3 appeared more or less rapidly in all genotypes, from 3 days after O_3 treatment started in Cima to one week in the other two genotypes (Fig. 4**A**–**C**). During the experimentation, although leaves were fully expanded, chlorophyll content continued to increase in ambient conditions, and then tended to stabilize. Exposure to O_3 resulted in a decrease in chlorophyll content, with 36%, 41% and 30% less chlorophyll under O_3 exposure than in ambient conditions for Carpaccio, Cima and Robusta, respectively.

Significant stomatal closure was observed after O_3 treatment for the three genotypes (Fig. 5**A**–**C**). It was linked with a significant decrease in net CO_2 assimilation (Fig. 4**D**–**F**). Robusta differed significantly once again, with higher stomatal conductance values and thus higher net CO_2 assimilation. Ci values were stable throughout the experiment (data not shown). Stomatal conductance differences led to genotype differences in the amplitude variations of POD_1 (Fig. 6). The effect of O_3 on chlorophyll content in relation to POD_1 was modelled as a linear adjustment. A polynomial

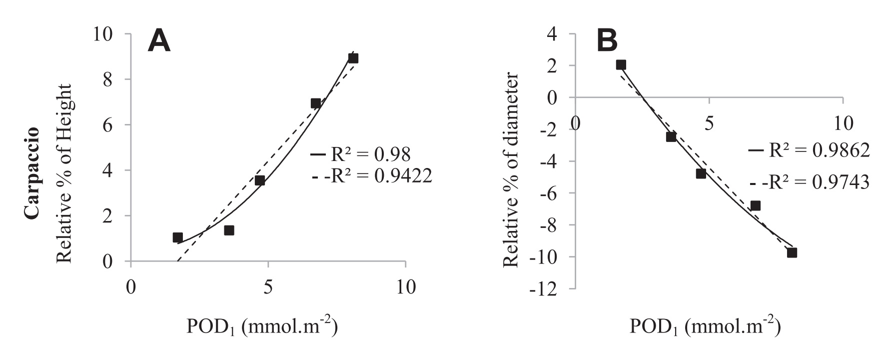


Fig. 3. Relationships between height (**A**) and diameter (**B**) relative to the control treatment (%) and phytotoxic ozone dose over a threshold of 1 nmol m^{-2} s^{-1} in Carpaccio. Two adjustment models were used: a linear regression (lin: solid line) and a polynomial regression of order 2 (pol: dotted line) with $y = 1.3327x - 2.2598$ and $y = 0.1407x^2 - 0.0596x + 0.4639$ as equations respectively.

Table 2
Evolution of the numbers of leaves, of fallen leaves and of biomass (means ± SE) of the three poplar genotypes Carpaccio, Cima and Robusta, before (*T0*) and after being submitted to 120 nmol mol^{-1} of O_3 or not (control treatment) for 18 days (*T18*). Treatment and genotype effect are considered as significant when $p < 0.05$ using the contrast method.

Genotype	Treatment|day	Number of leaves		Number of fallen leaves		Leaf biomass (g)		Stem biomass (g)		Root biomass (g)		Total biomass (g)		Root-shoot ratio	
		T0	*T18*	*T0*	*T18*	*T0*	*T18*	*T0*	*T18*	*T0*	*T18*	*T0*	*T18*	*T0*	*T18*
Carpaccio	Ambient	38 ± 0	52 ± 1	0 ± 0	1 ± 0	12.3 ± 0.5	22.4 ± 1.3	10 ± 0.3	27.2 ± 1.5	0.3 ± 0.1	4.4 ± 0.4	23.6 ± 0.9	54.0 ± 3.0	0.06 ± 0	0.09 ± 0
	Ozone		45 ± 1		10 ± 2		24.4 ± 0.5		24.1 ± 1.1		2.9 ± 0.3		51.3 ± 1.9		0.06 ± 0
Cima	Ambient	28 ± 1	40 ± 1	0 ± 0	1 ± 0	5.1 ± 0.3	16.6 ± 1.0	4.2 ± 0.3	15.2 ± 0.8	0.5 ± 0.0	2.5 ± 0.2	9.8 ± 0.6	34.3 ± 2.0	0.06 ± 0	0.08 ± 0
	Ozone		36 ± 1		4 ± 1		14.6 ± 0.9		13.5 ± 0.9		2.1 ± 0.4		30.2 ± 2.0		0.07 ± 0
Robusta	Ambient	32 ± 0	35 ± 1	0 ± 0	1 ± 0	9.8 ± 0.3	16.4 ± 1.6	4.6 ± 0.1	10.2 ± 0.6	1.8 ± 0.1	2.8 ± 0.4	16.2 ± 0.4	29.4 ± 2.5	0.12 ± 0	0.10 ± 0
	Ozone		30 ± 1		8 ± 1		15.3 ± 1.5		10 ± 0.6		2.7 ± 0.4		28.0 ± 2.5		0.10 ± 0
Treatment effect															
Carpaccio			0.00039		<0.001		ns		ns		ns		ns		ns
Cima			0.03936		ns		ns		ns		ns		ns		ns
Robusta			0.03937		<0.001		ns		ns		ns		ns		ns
Genotype effect															
Carpaccio:Cima			<0.001		ns		0.0184		0.00643		ns		0.013		ns
Cima:Robusta			ns		ns		ns		ns		ns		ns		<0.001
Robusta:Carpaccio			0.00621		ns		ns		0.01282		ns		ns		<0.001

regression of order 2 did not improve the relation (Fig. 6**A**–**C**). For net CO_2 assimilation, a linear regression was sufficient for Carpaccio and Robusta (Fig. 6**A** and **C**), although a polynomial regression of order 2 fitted better for Carpaccio. On the other hand, a real improvement was noted for Cima with a polynomial regression of order 2 (Fig. 6**E**).

Finally, A/g_w was about the same for all three genotypes (Fig. 5**D**–**F**), and it increased with O_3 treatment during the first week only. After 10 days, the difference disappeared.

3.3. Effects of ozone on the responses to variations in blue light

In control air conditions, dark-to-blue-light transition induced a significant genotypic effect on the amplitude of stomatal opening (Table 3). Cima displayed the biggest amplitude, more than double compared to Robusta which displayed the lowest. In addition, there was also a significant genotypic effect on the opening speed. Robusta was the slowest, with reaction rates 2–3 times lower than Carpaccio and Cima.

O_3 had no effect on the opening rate or speed of Robusta, whereas the amplitude and the speed of the response were reduced for the other two genotypes (Table 3). Under O_3 treatment, the amplitude of the response decreased in Carpaccio by around 75% and was around 40% lower for Cima. Opening speed was reduced by around 65% and 55% for Carpaccio and Cima, respectively, from the second week onward. The effects of O_3 on stomatal conductance were not linked to Ci variations, whose values remained stable (data not shown).

In control air conditions, there was no genotype effect on net CO_2 assimilation in the dark or in blue light conditions (Table 3). In the dark, the respiration of the three genotypes increased with O_3 treatment, especially from the second week, by around 90%, 30% and 55% for Carpaccio, Cima and Robusta, respectively. In addition, from the second week, the three genotypes continued to respire under blue light when submitted to O_3 treatment, whereas the controls began to photosynthesize.

3.4. Effects of ozone on the responses to variations in red light

In control air conditions, there was no significant genotypic effect on the amplitude or the speed of opening in response to an increase in red light (Table 4). From the second week, the amplitude of the reaction was significantly reduced by O_3 treatment in Carpaccio (by around 85%) and in Robusta (by around 75%), while it was reduced only during the last week in Cima (by around 75%). Finally, opening speed was not altered by O_3 exposure, except during the second week for Carpaccio and Robusta. The effects of O_3 on stomatal conductance were not linked to variations in Ci values, which remained stable (data not shown).

In control air conditions, the photosynthesis rate, under low or intense red light was more important in Robusta than in the other two genotypes (around 1.3 times more) (Table 4). From the second week, there was a decrease of photosynthesis under O_3 treatment. It was significant from the second week for Robusta with around 40% decrease and from the last week with 55% and 45% decrease for Carpaccio and Cima, respectively.

3.5. Effects of ozone on the responses to variations in CO_2

In control air conditions, Robusta closed its stomata significantly more slowly than the other two genotypes under an increased CO_2 concentration (3.3 and 1.7 times more slowly than Carpaccio and Cima, respectively), leading to a significant lengthening of the time needed for stomatal conductance to stabilize (Table 5). The treatment had no effect on closing speed or stabilization time in Robusta.

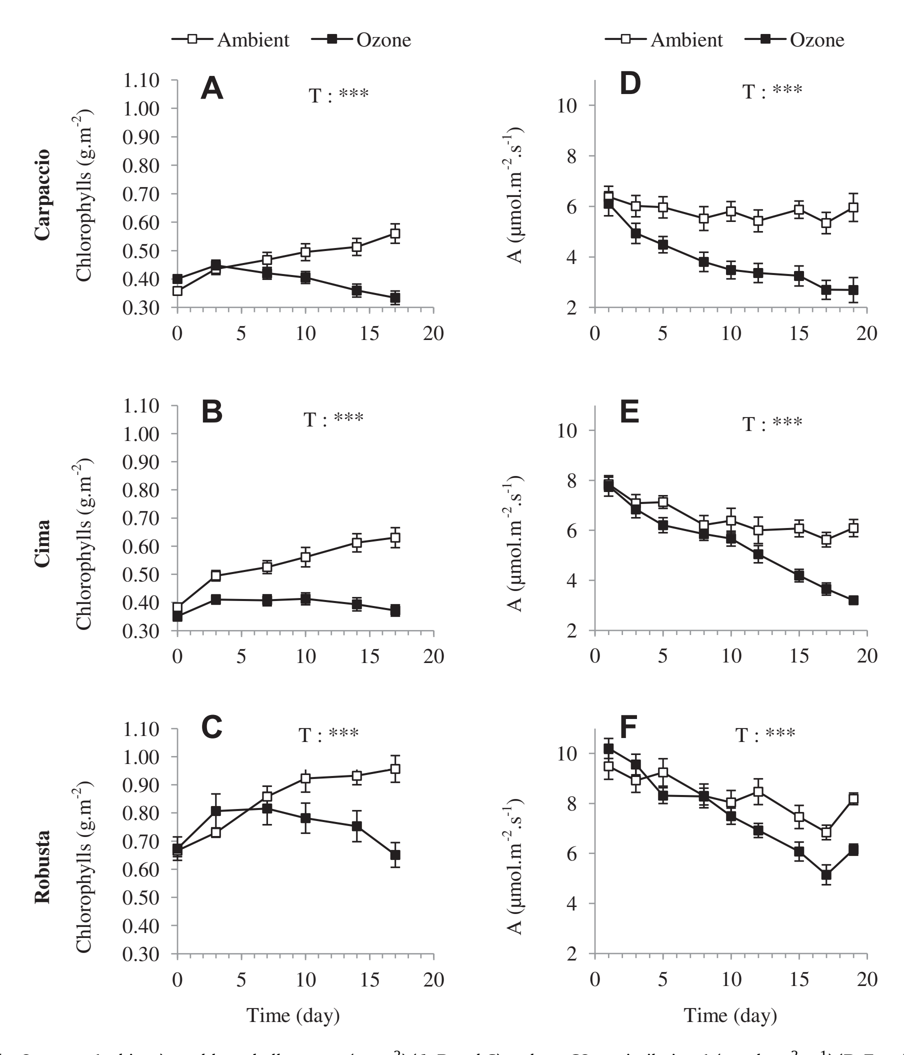


Fig. 4. Effects of O_3 treatment (■Ozone □Ambient) on chlorophyll content (g m^{-2}) (**A**, **B** and **C**) and net CO_2 assimilation A (µmol m^{-2} s^{-1}) (**D**, **E** and **F**) in the leaves of Carpaccio (**A** and **D**), Cima (**B** and **E**) and Robusta (**C** and **F**). Significant differences between treatments (*T*) are indicated by * ($p < 0.05$) ** ($p < 0.01$) or *** ($p < 0.001$).

In contrast, from the second week the opening speed was cut by half and the stabilization time was twice as long under O_3 treatment in Carpaccio and Cima. Although Ci values increased along with increased CO_2, the Ci/Ca ratio remained stable (data not shown).

In control air conditions, Robusta displayed a significantly higher photosynthesis rate under low and high CO_2 concentrations than Carpaccio and Cima (around 1.3 times more) (Table 5). Under O_3 treatment, with low or high CO_2 concentrations, all three genotypes had a lower photosynthesis rate than under ambient conditions. The effect was more and more pronounced as fumigation time increased and appeared from the first week for Robusta and from the second week for Cima and Carpaccio, with around 55% less photosynthesis the third week.

3.6. Effects of ozone on the responses to variations in VPD

In control air conditions, Robusta was the slowest to close its stomata in response to increased VPD, and Carpaccio was the fastest with almost a 10-fold difference between these extremes and a 6-fold difference for stabilization time (Table 6). O_3 had no clear effect on closing time or speed in Cima and Robusta, but decreased Carpaccio closing speed significantly by almost one half, and increased its stabilization time by almost 40%. The effects of O_3 on stomatal conductance were not linked to variations in Ci values, which remained stable (data not shown).

In control air conditions, there was no significant genotype effect on photosynthesis (Table 6). From the second week, whether with high or low VPD, O_3 increased respiration in the three genotypes (35%, 50% and 80% increase under low VPD, 65%, 90% and 50% increase under high VPD, for Carpaccio, Cima and Robusta, respectively). Such increases were only significant for Robusta.

4. Discussion

4.1. Effects of ozone on net CO_2 assimilation

In our experiments, we observed a decrease of stomatal conductance which reduced ozone uptake directly followed by an important decrease in net CO_2 assimilation. As highlighted by Wittig et al. (2009), net CO_2 assimilation reduction can have important effects on plant biomass that are in accordance with the slight decrease in total biomass we observed, but it can also result to important ecosystem effects with a decrease of the carbon-sink strength. In dark conditions, respiration was more important under O_3 treatment, and in the presence of low light, when photosynthesis prevailed on respiration for the control plants, respiration remained more important than photosynthesis for the plants under O_3 treatment. When light intensity was sufficient to have higher photosynthesis than respiration for the plants under O_3 treatment, net CO_2 assimilation was still much lower than in the

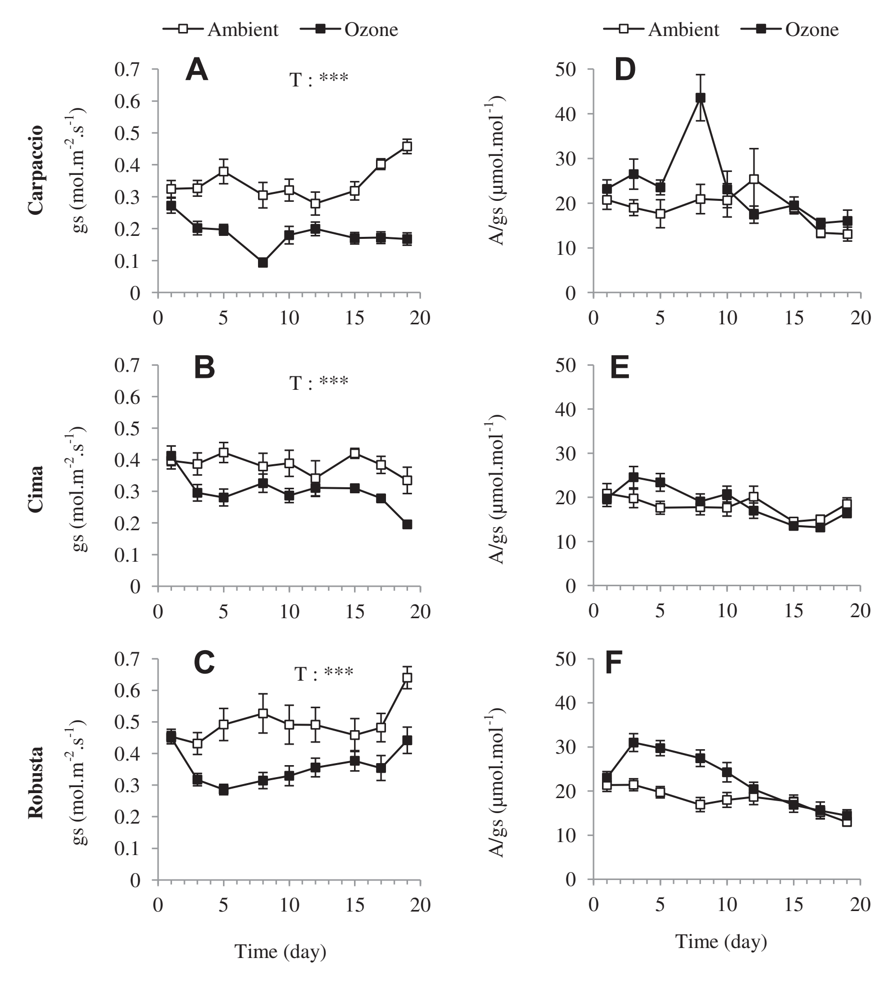


Fig. 5. Effects of O_3 treatment (■Ozone □Ambient) on stomatal conductance g_s (mol m^{-2} s^{-1}) (**A**, **B** and **C**) and on the water use efficiency A/g_s (μmol mol^{-1}) (**D**, **E** and **F**) of Carpaccio (**A** and **D**), Cima (**B** and **E**) and Robusta (**C** and **F**). Significant differences between treatments (*T*) are indicated by * ($p < 0.05$) ** ($p < 0.01$) or *** ($p < 0.001$).

controls. That effect can be due to the important decrease in chlorophyll content that results from O_3 exposure, and can also be linked, as suggested by Dghim et al. (in press), Dizengremel (2001), Dizengremel et al. (2008) and Wittig et al. (2009), to lower rubisco content and activity. The energy needs that remain unfulfilled by photosynthesis can be partly compensated for by respiration.

4.2. Effects of ozone on stomatal conductance

As previously written, O_3 flux, net CO_2 assimilation and transpiration are tightly linked to stomatal conductance. This requires a balance between O_3 entrance, water loss and CO_2 needs. Trees have to adjust their stomatal conductance to each change in environmental parameters to take advantage of the best conditions. Therefore stomatal opening and closing speed is a parameter of importance. We showed that O_3 had a first effect on stomatal conductance, so that decreased stomatal conductance reduced net CO_2 assimilation. That shift led to an increase in water use efficiency during the first week, which vanished once stomatal conductance had stabilized.

In the early morning, the increase in blue light opens the stomata and the increase in red light keeps them open (Shimazaki et al., 2007). O_3 slowed stomatal opening in response to an increase in blue light, but reduced stomatal aperture (Δg_s) in response to an increase in red light or blue light. These results suggest that the blue light-specific signalling cascade was slowed down at some point. The reduced amplitude of the response to variations in red or blue light may result from the alteration of the ion channels implied in stomatal opening (Torsethaugen et al., 1999). Decreased Δg_s led to a reduction of the O_3 flux, but as the reaction to an increase in blue light under O_3 treatment was slower, the trees may open their stomata more slowly in the morning when O_3 concentration is low, although conditions for stomatal opening are optimal.

Concerning the effect of O_3 on stomatal closure in response to high CO_2 or VPD, although there was no impact on Δg_s, the speed of the response was once again slowed down, so that more time was required to achieve a steady state under new environmental conditions. Trees with slower reactions may take more time to close their stomata when the air gets dry and then may lose more water because of higher transpiration rates.

This stomatal sluggishness should be taken into account in the models for calculating conductance by adding an O_3 function not only linked to phenology but also to the other functions, because the responses to variations in the environmental parameters we tested, i.e. blue light, red light, CO_2 and VPD, were altered under O_3 exposure in accordance with other studies (Grulke et al., 2007; Hayes et al., 2012; Hoshika et al., 2012; Onandia et al., 2011; Paoletti and Grulke, 2010). The mechanisms that account for sluggish stomatal responses during O_3 exposure are not fully understood yet. O_3 exposure mediates increases in apoplastic H_2O_2, which alters membrane permeability, specifically to cation influx (Castillo and Heath, 1990; Le Thiec et al., 1994; McAinsh et al., 2002; Pei et al., 2000; Torsethaugen et al., 1999). Recent advances have demonstrated that ABA plays an important role in response to pathogens and that the signalling pathways are very similar to the one of

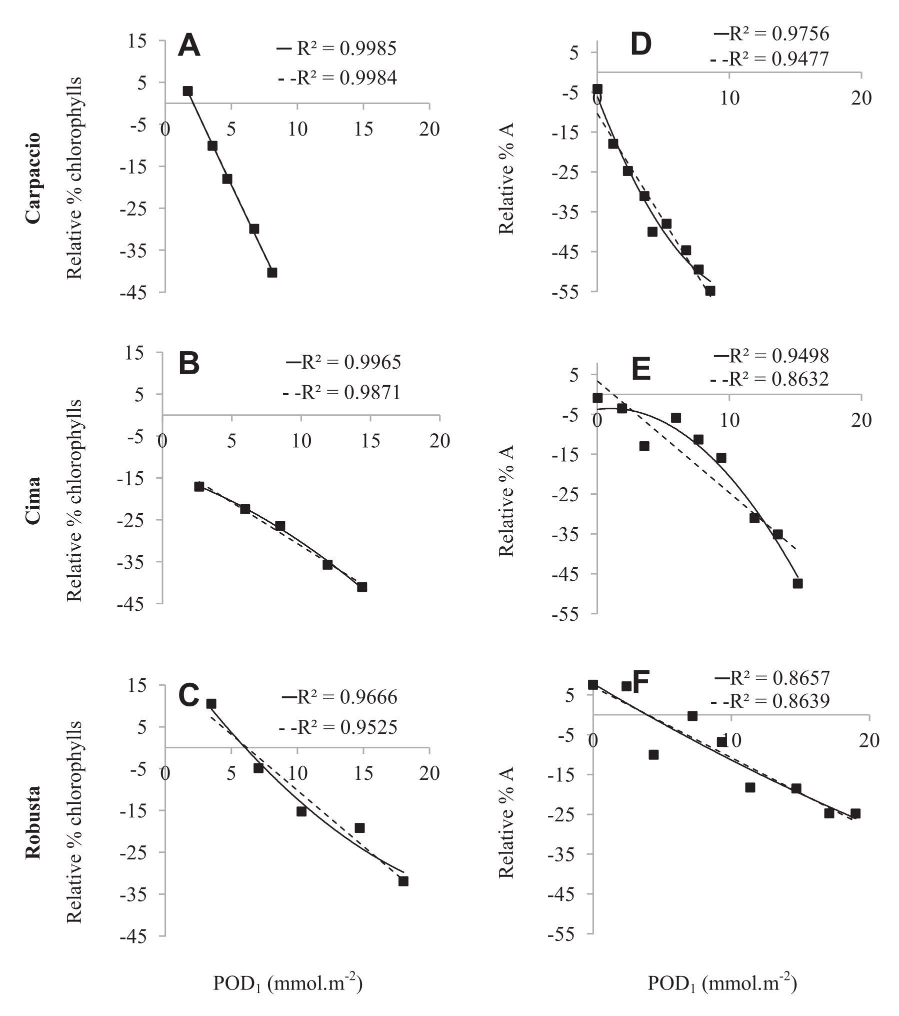


Fig. 6. Relationships between chlorophyll content (**A**, **B** and **C**) and CO_2 net assimilation (**D**, **E** and **F**) relative to the control treatment (%) in Carpaccio (**A** and **D**), Cima (**B** and **E**) and Robusta (**C** and **F**) and phytotoxic ozone dose over a threshold of 1 nmol m^{-2} s^{-1}. Two adjustment models were used: a linear regression (lin: solid line) with $y = -6.6588x + 13.964$, $y = -2.0817x - 10.446$ and $y = -3.0586x + 17.438$ as equations respectively for Carpaccio, Cima and Robusta for chlorophyll content and $y = -4.5184x - 11.267$, $y = -3.0024x + 1.1513$ and $y = -1.6972x + 4.7525$ for CO_2 net assimilation, and a polynomial regression of order 2 (pol: dotted line) with $y = 0.0283x^2 - 6.9386x + 14.511$, $y = -0.0588x^2 - 1.0742x - 13.742$ and $y = 0.0803x^2 - 4.5982x + 23.145$ as equations respectively for Carpaccio, Cima and Robusta for chlorophyll content and $y = 0.4423x^2 - 8.4054x - 6.2965$, $y = -0.2457x^2 + 0.4456x - 5.7112$ and $y = 0.0404x^2 - 2.4066x + 6.5356$ for CO_2 net assimilation.

abiotic stress tolerance (Lee and Luan, 2012). In fact, response to pathogens leads to ABA signal which, via NADPH oxidase, produce H_2O_2 (Ton et al., 2009). Ozone mimics this ROS production which acts as a signal to regulate several ion channels finally causing a stomatal closure (Wilkinson and Davies, 2010). If O_3 can change the functioning of different channels as in the study of Vahisalu et al. (2010), it would be relevant to study their gene expression in response to O_3 directly in guard cells.

4.3. Differences between the three genotypes

The three genotypes are characterized by differences in stomatal responses to O_3. Robusta was the shortest genotype and displayed the most important decrease in leaf production and the highest percentage of fallen leaves. It seemed more sensitive to O_3, with more visible leaf injuries (data not shown). It had the highest stomatal conductance and the highest chlorophyll content, but it also showed slower stomatal reactions than the other two genotypes in the control treatment. Its sensitivity may be linked to that stomatal conductance characteristic, in accordance with the study of Brosché et al. (2010) which concluded about a major role of stomatal conductance in O_3 sensitivity. Indeed, Robusta experienced a higher O_3 flux, thus a higher POD_1 and, as suggested by Paoletti and Grulke (2010), a slower stomatal response could play a major role in O_3 sensitivity. Carpaccio and Cima reacted quite similarly and appeared less sensitive than Robusta. Nevertheless, Carpaccio, which seemed the less sensitive, closed its stomata more than Cima under O_3 treatment, reducing O_3 entrance more than Cima, and reacted more quickly in adjusting its stomatal conductance to environmental parameters. While Robusta sensitivity can be explained by slower stomatal conductance responses, Cima sensitivity was not found linked to stomatal behaviour, and may thus be explained by the second type of defence reactions, i.e. detoxification processes.

Finally, we can hypothesize that in natural conditions, Robusta may take more time than Cima and Carpaccio to reach a steady state due to slower stomatal opening and higher final conductance (Fig. 7**A**). At midday, if the VPD rises too much, Carpaccio and Cima may partially close their stomata to save water, but Robusta is less reactive and then will lose more water. Finally, at the end of the day, Robusta may take more time to close its stomata. In the morning, the stomatal conductance of Robusta may limit its photosynthesis (Fig. 7**A**, spotted area). Rapidly, Robusta stomatal conductance may become higher, leading to higher water losses, especially in the

Table 3

Dynamic gas exchange responses to a blue light increase (from 0 to 30 μmol m^{-2} s^{-1}) (means ± SE) of the three poplar genotypes Carpaccio, Cima and Robusta, submitted to 120 nmol mol^{-1} of O_3 or not (control treatment) after 1, 2 or 3 weeks. Δg_s (mmol m^{-2} s^{-1}), span of stomatal conductance variation, v (mmol m^{-2} s^{-2}), stomatal opening speed, $A0$ (μmol m^{-2} s^{-1}), assimilation before blue light variation, $A1$ (μmol m^{-2} s^{-1}), assimilation after blue light variation. Treatment and genotype effect and treatment × genotype interaction are considered significant when $p < 0.05$.

Genotype	Parameters treatment\time	g_s0			Δg_s			v			$A0$			$A1$		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Carpaccio	Ambient	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.13 ± 0.01	58 ± 13	75 ± 8	82 ± 15	−1.03 ± 0.16	−1.09 ± 0.21	−1.01 ± 0.05	0.49 ± 0.31	−0.07 ± 0.31	0.55 ± 0.18
	Ozone	0.06 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01	60 ± 4	28 ± 20	25 ± 8	−0.96 ± 0.27	−2.39 ± 0.33	−1.59 ± 0.06	0.44 ± 0.18	−1.10 ± 0.48	−0.32 ± 0.14
Cima	Ambient	0.07 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	59 ± 8	61 ± 4	67 ± 23	−1.37 ± 0.17	−1.90 ± 0.3	−1.05 ± 0.15	0.32 ± 0.55	0.17 ± 0.53	0.79 ± 0.28
	Ozone	0.17 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.12 ± 0.03	52 ± 7	23 ± 6	34 ± 4	−1.52 ± 0.12	−2.35 ± 0.16	−1.56 ± 0.27	−0.37 ± 0.37	−0.80 ± 0.18	−0.66 ± 0.12
Robusta	Ambient	0.16 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	28 ± 5	22 ± 7	25 ± 5	−0.69 ± 0.45	−1.18 ± 0.38	−1.08 ± 0.16	0.29 ± 0.39	0.39 ± 0.28	0.48 ± 0.28
	Ozone	0.14 ± 0.05	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01	28 ± 2	31 ± 5	20 ± 8	−1.09 ± 0.26	−1.65 ± 0.39	−1.85 ± 0.22	0.35 ± 0.24	−0.09 ± 0.17	−0.85 ± 0.25
Treatment effect																
Carpaccio		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.00668	ns	<0.001	ns	ns	ns	ns
Cima		ns	ns	ns	ns	0.00291	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Robusta		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.015
Genotype effect																
Carpaccio:Cima		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cima:Robusta		ns	ns	ns	<0.001	0.02477	0.00386	ns	0.02759	0.00982	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Robusta:Carpaccio		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0.001	<0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Genotype × treatment																
Carpaccio:Cima:O_3		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cima:Robusta:O_3		ns	ns	ns	ns	0.03377	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Robusta:Carpaccio:O_3		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Table 4

Dynamic gas exchange responses to a red light increase (from 200 to 800 μmol m^{-2} s^{-1}) (means ± SE) of the three poplar genotypes Carpaccio, Cima and Robusta, submitted to 120 nmol mol^{-1} of O_3 or not (control treatment) after 1, 2 or 3 weeks. Δg_s (mmol m^{-2} s^{-1}), span of stomatal conductance variation, v (mmol m^{-2} s^{-2}), stomatal opening speed, $A0$ (μmol m^{-2} s^{-1}), assimilation before red light variation, $A1$ (μmol m^{-2} s^{-1}), assimilation after red light variation. Treatment and genotype effect and treatment × genotype interaction are considered significant when $p < 0.05$.

Genotype	Parameters treatment\time	g_s0			Δg_s			v			$A0$			$A1$		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Carpaccio	Ambient	0.29 ± 0.00	0.27 ± 0.06	0.21 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02	29 ± 10	52 ± 13	30 ± 6	7.57 ± 0.74	7.58 ± 0.21	8.16 ± 0.54	13.78 ± 1.12	14.02 ± 0.89	13.76 ± 1.28
	Ozone	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.06 ± 0.02	−0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01	25 ± 8	−1 ± 8	32 ± 11	7.43 ± 0.93	5.32 ± 0.41	3.82 ± 0.48	14.02 ± 1.88	8.87 ± 0.86	6.02 ± 0.62
Cima	Ambient	0.29 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.05	0.15 ± 0.03	32 ± 10	37 ± 22	42 ± 13	7.88 ± 1.03	7.93 ± 0.96	8.71 ± 0.71	15.40 ± 2.46	16.23 ± 2.27	19.20 ± 1.09
	Ozone	0.26 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.30 ± 0.05	0.06 ± 0.03	0.10 ± 0.00	0.04 ± 0.01	21 ± 8	45 ± 8	21 ± 11	7.93 ± 0.72	5.79 ± 0.64	4.68 ± 1.10	15.38 ± 0.89	10.77 ± 0.98	6.43 ± 0.59
Robusta	Ambient	0.31 ± 0.06	0.39 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.03	27 ± 7	42 ± 7	24 ± 7	10.90 ± 0.40	10.26 ± 0.83	9.67 ± 0.92	20.50 ± 0.39	20.98 ± 0.22	17.77 ± 0.25
	Ozone	0.29 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.00	26 ± 11	7 ± 1	40 ± 26	9.58 ± 0.85	6.86 ± 0.90	5.07 ± 0.30	18.39 ± 1.83	12.19 ± 1.97	7.61 ± 0.66
Treatment effect																
Carpaccio		ns	ns	ns	ns	0.0057	ns	ns	0.00243	ns	ns	ns	0.00122	ns	ns	0.00285
Cima		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0.001	ns	0.02613	<0.001
Robusta		ns	ns	ns	ns	<0.001	ns	ns	ns	ns	ns	0.03424	<0.001	ns	<0.001	<0.001
Genotype effect																
Carpaccio:Cima		ns	ns	0.00991	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cima:Robusta		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Robusta:Carpaccio		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.02205	0.01514	ns
Genotype × treatment																
Carpaccio:Cima:O_3		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cima:Robusta:O_3		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Robusta:Carpaccio:O_3		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Table 5
Dynamic gas exchange responses to a CO_2 increase (from 400 to 1200 μmol CO_2 mol^{-1}) (means ± SE) of the three poplar genotypes Carpaccio, Cima and Robusta, submitted to 120 nmol mol^{-1} of O_3 or not (control treatment) after 1, 2 or 3 weeks. t (s), time taken for stomata to close, v (mmol m^{-2} s^{-2}), stomatal closing speed, $A0$ (μmol m^{-2} s^{-1}), assimilation before CO_2 variation, $A1$ (μmol m^{-2} s^{-1}), assimilation after CO_2 variation. Treatment and genotype effect and treatment × genotype interaction are considered significant when $p < 0.05$.

Genotype	Parameters treatment\time	t			v			A0			A1		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Carpaccio	Ambient	2309 ± 120	1734 ± 109	2162 ± 291	−67 ± 6	−85 ± 30	−85 ± 31	14.47 ± 0.74	14.27 ± 1.28	12.75 ± 0.97	16.90 ± 1.85	18.88 ± 2.01	16.93 ± 1.43
	Ozone	2151 ± 780	3677 ± 206	3728 ± 94	−58 ± 20	−41 ± 4	−40 ± 6	14.64 ± 1.23	9.19 ± 1.22	5.66 ± 0.35	15.23 ± 3.36	12.88 ± 1.98	7.37 ± 0.34
Cima	Ambient	4414 ± 1344	4673 ± 433	3699 ± 306	−42 ± 14	−39 ± 3	−42 ± 3	12.4 ± 1.49	16.35 ± 1.66	15.74 ± 2.02	15.65 ± 1.39	19.76 ± 3.47	19.99 ± 2.41
	Ozone	4939 ± 1245	6081 ± 1386	10826 ± 975	−38 ± 7	−22 ± 7	−18 ± 3	14.25 ± 0.77	8.55 ± 1.19	6.70 ± 0.35	19.40 ± 1.38	13.13 ± 1.87	9.32 ± 1.18
Robusta	Ambient	6670 ± 2052	5873 ± 2389	8830 ± 887	−30 ± 5	−22 ± 5	−19 ± 0	19.21 ± 0.67	17.75 ± 1.76	17.61 ± 0.52	26.31 ± 2.28	24.59 ± 3.45	23.42 ± 0.87
	Ozone	5321 ± 1657	6274 ± 2026	7852 ± 1513	−25 ± 5	−15 ± 1	−18 ± 5	13.71 ± 1.36	10.15 ± 1.94	6.20 ± 0.51	19.00 ± 0.34	15.35 ± 2.36	10.09 ± 0.54
Treatment effect													
Carpaccio		ns	0.00247	0.03739	ns	ns	ns	ns	0.00591	<0.001	ns	ns	0.01960
Cima		ns	ns	<0.001	ns	ns	ns	ns	<0.001	<0.001	ns	ns	<0.001
Robusta		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.00433	<0.001	ns	ns	<0.001
Genotype effect													
Carpaccio:Cima		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cima:Robusta		ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.00689	ns	ns	0.00642	ns	ns
Robusta:Carpaccio		ns	ns	0.0064	ns	0.032	0.0212	ns	ns	ns	0.04074	ns	ns
Genotype × treatment													
Carpaccio:Cima:O_3		ns	ns	0.0088	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cima:Robusta:O_3		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Robusta:Carpaccio:O_3		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Table 6
Dynamic gas exchange responses to a VPD increase (from 0.8 to 3 kPa) (means ± SE) of the three poplar genotypes Carpaccio, Cima and Robusta, submitted to 120 nmol mol^{-1} of O_3 or not (control treatment) after 1, 2 or 3 weeks. t (s), time taken for stomata to close, v (mmol m^{-2} s^{-2}), stomatal closing speed, $A0$ (μmol m^{-2} s^{-1}), assimilation before VPD variation, $A1$ (μmol m^{-2} s^{-1}), assimilation after VPD variation. Treatment and genotype effect and treatment × genotype interaction are considered significant when $p < 0.05$.

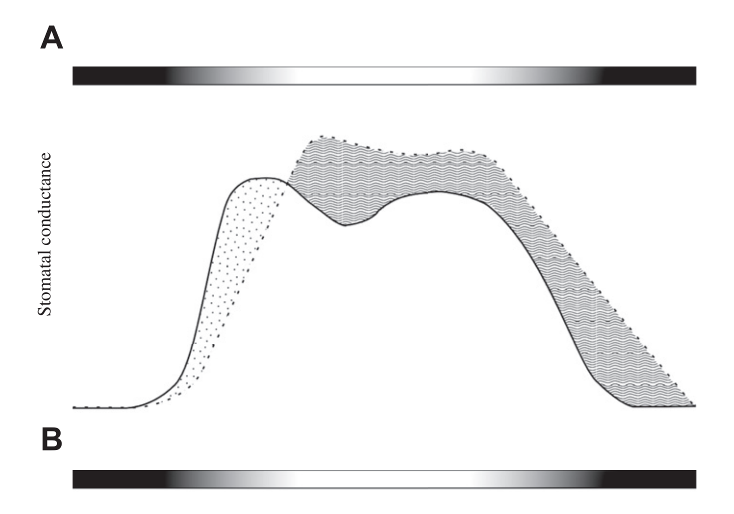
Genotype	Parameters treatment\time	t			v			A0			A1		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Carpaccio	Ambient	1723 ± 169	1221 ± 145	1040 ± 90	−161 ± 6	−173 ± 5	−149 ± 9	−1.26 ± 0.34	−1.44 ± 0.15	−1.37 ± 0.19	−1.22 ± 0.03	−1.57 ± 0.19	−1.15 ± 0.17
	Ozone	2262 ± 275	1824 ± 122	1399 ± 519	−81 ± 9	−90 ± 25	−117 ± 34	−1.04 ± 0.13	−1.83 ± 0.24	−1.98 ± 0.19	−0.78 ± 0.06	−1.33 ± 0.09	−1.91 ± 0.36
Cima	Ambient	6520 ± 2770	3798 ± 553	1663 ± 108	−35 ± 14	−79 ± 24	−111 ± 31	−1.76 ± 0.26	−1.62 ± 0.36	−1.35 ± 0.42	−1.52 ± 0.64	−1.33 ± 0.39	−0.89 ± 0.39
	Ozone	5040 ± 1183	1768 ± 256	4435 ± 1106	−43 ± 12	−131 ± 6	−72 ± 21	−1.64 ± 0.01	−2.28 ± 0.25	−2.13 ± 0.22	−1.62 ± 0.17	−2.14 ± 0.17	−2.11 ± 0.48
Robusta	Ambient	8982 ± 58	8785 ± 2324	5469 ± 1756	−16 ± 7	−18 ± 6	−31 ± 9	−1.21 ± 0.02	−1.2 ± 0.14	−1.04 ± 0.2	−1.54 ± 0.04	−1.19 ± 0.13	−1.29 ± 0.25
	Ozone	9016 ± 1743	4643 ± 250	6857 ± 629	−11 ± 2	−17 ± 6	−18 ± 2	−1.33 ± 0.11	−1.91 ± 0.16	−2.17 ± 0.27	−1.15 ± 0.11	−2 ± 0.26	−1.79 ± 0.24
Treatment effect													
Carpaccio		ns	ns	ns	0.01605	0.01162	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.0296
Cima		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Robusta		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.0096	<0.001	ns	0.0419	ns
Genotype effect													
Carpaccio:Cima		0.0022	ns	ns	<0.001	<0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cima:Robusta		ns	ns	ns	ns	0.00935	0.00278	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Robusta:Carpaccio		<0.001	<0.001	0.01401	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Genotype × treatment													
Carpaccio:Cima:O_3		ns	ns	ns	ns	0.00118	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cima:Robusta:O_3		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Robusta:Carpaccio:O_3		ns	ns	ns	ns	0.02246	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

middle of the day, and higher net CO_2 assimilation (Fig. 7**A**, undulated area). When light decreases, Robusta may lose more water, but its carbon gain may be limited by low light. In the presence of O_3 but before any effects of O_3 on stomatal conductance, the O_3 uptake of Robusta may be higher at midday, leading to higher sensitivity.

Since 2011, the threshold for POD_Y calculations for trees has been 1 nmol m^{-2} s^{-1}, so that a linear relation with biomass loss can normally be obtained. In our study we show that the use of POD_1 to get a linear relation with physiological parameters is not always sufficient. Differences of sensitivity within the same species between genotypes were even observed, indicating that the best adapted threshold can vary from one genotype to another, from one species to another and that maybe, for some parameters, the best adapted relation is not linear.

4.4. Suggested impact of ozone on the daily time course of stomatal conductance and its effects

Based on our results, we can infer the effect of O_3 on the daily course of stomatal conductance in natural conditions (Fig. 7**B**). We showed that (i) in the early morning, opening speed in response to the increase in blue light could be reduced, (ii) the opening rate in response to an increase in light was also reduced, and (iii) the closing speed in response to an increase in CO_2 or VPD was reduced. Thus, such changes may lead to water saving in the morning and throughout the day (Fig. 7**B**, spotted area), but in the evening, they may lead to a loss of water in the presence of O_3 compared to the control (Fig. 7**B**, undulated area). The O_3 flux may be reduced by the impact of O_3 on stomatal conductance during the day, but in the evening, as stomata may close more slowly, the O_3 flux may be more important. Finally, net CO_2 assimilation may be limited by the lower stomatal conductance in the morning and during the day, and in the evening, the limitation may come from lower light, so that the higher conductance has no positive effect.



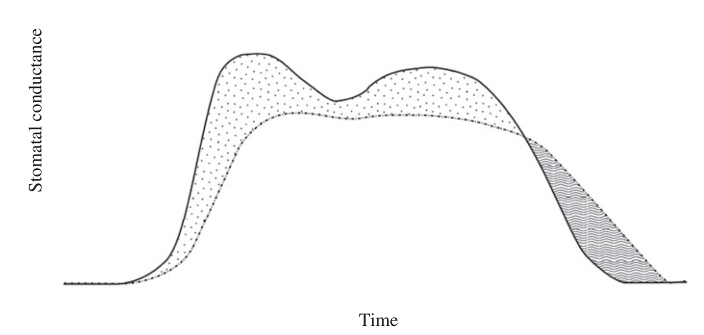


Fig. 7. Hypothetical daily courses of stomatal conductance in natural conditions. (**A**) Differences between genotypes with an ambient ozone concentration for Robusta (dotted line), Carpaccio and Cima (solid line) (**B**) Differences between low (solid line) and high (dotted line) ozone concentrations on Carpaccio and Cima.

5. Conclusions

O_3 impacts stomatal conductance by decreasing it, but in this study we report specific effects of O_3 on poplar responses to four different environmental parameters. Our results show that the effect of O_3 should be taken into account in the stomatal conductance models used for O_3 risk assessment, and not only as related to phenology. The responses of stomatal conductance to variations in blue light, red light, CO_2 and VPD are directly altered by O_3. Further studies are needed to characterize these impacts and improve stomatal conductance models like the DO3SE model. Moreover, to explain how O_3 modifies the response to those parameters, we need to improve our knowledge of the impact of O_3 on the different signalling steps, and of the ion channels involved in the stomatal movements due to variations in environmental parameters.

Acknowledgements

The authors are thankful to Cyril Buré, Stéphane Martin, Franck Radnai and Aurélie Heinis for technical assistance. The research was supported by the French National Research Agency, ANR, project VMCS "Vulnoz", and Jennifer Dumont was supported by a PhD grant from the ANR and the Lorraine Region. We thank the nursery of Guéméné Penfao for providing the cuttings.

References

Ainsworth, E.A., Yendrek, C.R., Sitch, S., Collins, W.J., Emberson, L.D., 2012. The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. Annual Review of Plant Biology 63, 15.1–15.25.
ASPA, 2010. Bilan de qualité de l'air en Alsace: Période 2000 à 2009.
Avnery, S., Mauzerall, D.L., Liu, J., Horowitz, L.W., 2011. Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 1. Year 2000 crop production losses and economic damage. Atmospheric Environment 45, 2284–2296.
Bagard, M., Le Thiec, D., Delacote, E., Hazenfratz-Sauder, M.P., Banvoy, J., Gérard, J., Dizengremel, P., Jolivet, Y., 2008. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. Physiologia Plantarum 134, 559–574.
Betzelberger, A.M., Gillespie, K.M., McGrath, J.M., Koester, R.P., Nelson, R.L., Ainsworth, E.A., 2010. Effects of chronic elevated ozone concentration on antioxidant capacity, photosynthesis and seed yield of 10 soybean cultivars. Plant, Cell & Environment 33, 1569–1581.
Brosché, M., Merilo, E., Mayer, F., Pechter, P., Puzõrjova, I., Brader, G., Kangasjärvi, J., Kollist, H., 2010. Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance. Plant, Cell & Environment 33, 914–925.
Büker, P., Morrissey, T., Briolat, A., Fall, R., Simpson, D., Tuovinen, J.-P., Alonso, R., Barth, S., Baumgarten, M., Grulke, N., Karlsson, P.E., King, J., Lagergren, F., Matyssek, R., Nunn, A., Ogaya, R., Penuelas, J., Rhea, L., Schaub, M., Uddling, J., Werner, W., Emberson, L.D., 2012. DO_3SE modelling of soil moisture to determine ozone flux to forest trees. Atmospheric Chemistry and Physics 12, 5537–5562.
Castagna, A., Ranieri, A., 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: from O_3 uptake to gene expression adjustment. Environmental Pollution 157, 1461–1469.
Castillo, F.J., Heath, R.L., 1990. Ca^{2+} transport in membrane vesicles from pinto bean leaves and its alteration after ozone exposure. Plant Physiology 94, 788–795.
Danielsson, H., Karlsson, G.P., Karlsson, P.E., Pleijel, H., 2003. Ozone uptake modeling and flux-response relationships – an assessment of ozone-induced yield loss in spring wheat. Atmospheric Environment 37, 475–485.
Dghim, A.A., Dumont, J., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Dizengremel, P., Le Thiec, D., Jolivet, Y. Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone sensitivity. Physiologia Plantarum, in press.
Dizengremel, P., 2001. Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. Plant Physiology and Biochemistry 39, 729–742.
Dizengremel, P., Le Thiec, D., Bagard, M., Jolivet, Y., 2008. Ozone risk assessment for plants: central role of metabolism-dependent changes in reducing power. Environmental Pollution 156, 11–15.

Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Cambridge, H.M., Simpson, D., Tuovinen, J.-P., 2000. Modelling stomatal ozone flux around Europe. Environmental Pollution 109, 403–413.
Fagerli, H., Gauss, M., Benedictow, A., Griesfeller, J., Jonson, J.E., Nyiri, A., Schulz, M., Simpson, D., Steensen, B.M., Tsyro, S., Valdebenito, A., Wind, P., Aas, W., Hjellbrekke, A.-G., Mareckova, K., Wankmüller, R., Iversen, T., Kirkevag, A., Seland, O., Vieno, M., 2011. Transboundary Acidification, Eutrophication and Ground Level Ozone in Europe in 2009. EMEP Status Report 1/2011. The Norwegian Meteorological Institute, Oslo, Norway.
Felzer, B.S., Cronin, T., Reilly, J.M., Melillo, J.M., Wang, X., 2007. Impacts of ozone on trees and crops. Comptes Rendus Geoscience, 11–12.
Fuhrer, J., Skärby, L., Ashmorer, M.R., 1997. Critical levels of ozone effects on vegetation in Europe. Environmental Pollution 97, 91–106.
Gerosa, G., Marzuoli, R., Desotgiu, R., Bussotti, F., Ballarin-Denti, A., 2009. Validation of stomatal flux approach for the assessment of ozone visible injury in young forest trees. Results from the TOP (transboundary ozone pollution) experiment at Curno, Italy. Environmental Pollution 157, 1497–1505.
Grulke, N.E., Neufeld, H.S., Davison, A.W., Roberts, M., Chappelka, A.H., 2007. Stomatal behavior of ozone-sensitive and -insensitive coneflowers (*Rudbeckia laciniata* var. *digitata*) in Great Smoky Mountains National Park. New Phytologist 173, 100–109.
Hayes, F., Jones, M.L.M., Mills, G., Ashmore, M., 2007. Meta-analysis of the relative sensitivity of semi-natural vegetation species to ozone. Environmental Pollution 146, 754–762.
Hayes, F., Wagg, S., Mills, G., Wilkinson, S., Davies, W., 2012. Ozone effects in a drier climate: implication for stomatal fluxes of reduced stomatal sensitivity to soil drying in a typical grassland species. Global Change Biology 18, 948–959.
Heath, R.L., 2008. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: what are the various routes to change? Environmental Pollution 155, 453–463.
Hoshika, Y., Watanabe, M., Inada, N., Koike, T., 2012. Ozone-induced stomatal sluggishness develops progressively in Siebold's beech (Fagus crenata). Environmental Pollution 166, 152–156.
Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., 2008. Simultaneous inference in general parametric models. Biometrical Journal 50 (3), 346–363.
IPCC, 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Summary for Policymakers. WG1, AR4. Available from: http://ipccwg1.ucar.edu/wg1/wg1-report.html.
Jarvis, P.G., 1976. The interpretation of variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopied in the field. Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences 273, 593–610.
Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., Karjalainen, R., 1994. Plant defence systems induced by ozone. Plant, Cell & Environment 17, 783–794.
Karlsson, P.E., Braun, S., Broadmeadow, M., Elvira, S., Emberson, L., Gimeno, B.S., Le Thiec, D., Novak, K., Oksanen, E., Schaub, M., Uddling, J., Wilkinson, M., 2007. Risk assessments for forest trees: the performance of the ozone flux versus the AOT concepts. Environmental Pollution 146, 608–616.
Lee, S.C., Luan, S., 2012. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. Plant, Cell & Environment 35, 53–60.
Le Thiec, D., Rose, C., Garrec, J.P., Laffray, D., Louguet, P., Galaup, S., Loosveldt, P., 1994. Alteration of element content in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study. Canadian Journal of Botany 72, 86–92.
Massman, W.J., 1998. A review of the molecular diffusivities of H_2O, CO_2, CH_4, CO, O_3, SO_2, NH_3, N_2O, NO, and NO_2 in air, O_2 and N_2 near STP. Atmospheric Environment 32, 1111–1127.
Matyssek, R., Wieser, G., Ceulemans, R., Rennenberg, H., Pretzsch, H., Haberer, K., Löw, M., Nunn, A.J., Werner, H., Wipfler, P., Oßwald, W., Nikolova, P., Hanke, D.E., Kraigher, H., Tausz, M., Bahnweg, G., Kitao, M., Dieler, J., Sandermann, H., Herbinger, K., Grebenc, T., Blumenröther, M., Deckmyn, G., Grams, T.E.E., Heerdt, C., Leuchner, M., Fabian, P., Häberle, K.-H., 2010. Enhanced ozone strongly reduces carbon sink strength of adult beech (*Fagus sylvatica*) – resume from the free-air fumigation study at Kranzberg Forest. Environmental Pollution 158, 2527–2532.
McAinsh, M.R., Evans, N.H., Montgomery, L.T., North, K.A., 2002. Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. New Phytologist 153, 441–447.
MEDDTL, 2010. Bilan de la qualité de l'air en France en 2010.
Mills, G., Hayes, F., Wilkinson, S., Davies, W.J., 2009. Chronic exposure to increasing background ozone impairs stomatal functioning in grassland species. Global Change Biology 15, 1522–1533.
Onandia, G., Olsson, A.-K., Barth, S., King, J.S., Uddling, J., 2011. Exposure to moderate concentrations of tropospheric ozone impairs tree stomatal response to carbon dioxide. Environmental Pollution 159, 2350–2354.
Pandey, S., Zhang, W., Assmann, S.M., 2007. Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. FEBS Letters 581, 2325–2336.
Paoletti, E., 2004. Ozone slows stomatal response to light and leaf wounding in a Mediterranean evergreen broadleaf, Arbutus Unedo. Environmental Pollution 134, 439–445.
Paoletti, E., Grulke, N.E., 2010. Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. Environmental Pollution 158, 2664–2671.
Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G., Grill, E., Schroeder, J.I., 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. Nature 406, 731–734.
Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Deepayan, S., R Development Core Team, 2012. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. In: R Package Version 3.1-103.
Pleijel, H., Danielsson, H., Vandermeiren, K., Blum, C., Colls, J., Ojanperä, K., 2002. Stomatal conductance and ozone exposure in relation to potato tuber yield – results from the European CHIP programme. European Journal of Agronomy 17, 303–317.
R Development Core Team, 2012. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0. URL. http://www.R-project.org/.
Renaut, J., Bohler, S., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Sergeant, K., Ahsan, N., Jolivet, Y., Dizengremel, P., 2009. The impact of atmospheric composition on plants: a case study of ozone and poplar. Mass Spectrometry Reviews 28, 495–516.
Shimazaki, K.I., Doi, M., Assmann, S.M., Kinoshita, T., 2007. Light regulation of stomatal movement. Annual Review of Plant Biology 58, 219–247.
Sitch, S., Cox, P.M., Collins, W.J., Huntingford, G., 2007. Indirect radiating forcing of climate change through ozone effects on the land-carbon sink. Nature 448, 791–795.
Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. Trends in Plant Science 14, 310–317.
Torsethaugen, G., Pell, E.J., Assmann, S.M., 1999. Ozone inhibits guard cell $K+$ channels implicated in stomatal opening. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 13577–13582.
Vahisalu, T., Puzorjova, I., Brosche, M., Valk, E., Lepiku, M., Moldau, H., Pechter, P., Wang, Y.S., Lindgren, O., Salojarvi, J., Loog, M., Kangasjarvi, J., Kollist, H., 2010. Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. Plant Journal 62, 442–453.
Van Dingenen, R., Dentener, F.J., Raes, F., Krol, M.C., Emberson, L., Cofala, J., 2009. The global impact of ozone on agricultural crop yields under current and future air quality legislation. Atmospheric Environment 43, 604–618.
Vingarzan, R., 2004. A review of surface ozone background levels and trends. Atmospheric Environment 38, 3431–3442.
Wang, Y., Nogushi, K., Terashima, I., 2011. Photosynthesis-dependent and -independent responses of stomata to blue, red and green monochromatic light: differences between the normally oriented and inverted leaves of sunflower. Plant and Cell Physiology 52, 479–489.
Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology 144, 307–313.
Wilkinson, S., Davies, W.J., 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. Plant, Cell & Environment 33, 510–525.
Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Naidu, S.L., Karnosky, D.F., Long, S.P., 2009. Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta – analysis. Global Change Biology 15, 396–424.

2. REPONSES DISTINCTES DES STOMATES SUR LA FACE ABAXIALE ET ADAXIALE EN REPONSE A L'OZONE CHEZ TROIS GENOTYPES DE PEUPLIER EURAMERICAIN

Sous l'effet de l'ozone, nous avons montré que la conductance stomatique des feuilles baisse et que les vitesses d'ouverture et de fermeture des stomates aux différents facteurs environnementaux sont ralenties. Les mouvements stomatiques sont liés à des flux d'ions impliquant des canaux plasmiques et vacuolaires. L'impact de l'ozone sur les mouvements stomatiques en réponse aux variations de paramètres environnementaux pourrait être le résultat de différents effets directs sur les cellules de garde comme une modification de l'ultrastructure, une perturbation du contenu en éléments minéraux ou encore une altération des flux par les canaux ioniques.

Nous avons donc cherché à comprendre par quels mécanismes les mouvements stomatiques étaient perturbés par l'ozone, grâce à la combinaison d'approches microscopiques et génomique. De plus, le peuplier étant une espèce amphistomatique, nous avons choisi d'étudier l'effet de l'ozone sur la conductance stomatique de chacune des faces de la feuille distinctement, afin de voir s'il existait des différences. Cette étude montre que :

- la conductance stomatique baisse d'abord sur la face supérieure avant d'être légèrement réduite sur la face inférieure.
- l'ozone entraîne un accroissement du nombre de mitochondries dans les cellules de garde des deux faces.
- l'ozone induit une augmentation du contenu en calcium dans les cellules de garde de la face supérieure des feuilles. Chez le génotype résistant (Carpaccio) l'augmentation a lieu sur les deux faces.
- l'ozone provoque une diminution du contenu en chlore dans les cellules de garde sauf chez le génotype le plus sensible (Robusta), où nous observons un accroissement.

- l'ozone conduit à une hausse du contenu en potassium dans les cellules de garde qui apparait plus tôt chez le génotype le plus sensible (Robusta).
- l'ozone engendre une baisse du contenu en phosphore dans les cellules de garde des deux faces avec un effet plus marqué sur la face inférieure.
- l'expression des gènes codant pour les canaux de calcium vacuolaires et les anhydrases carboniques impliquées dans la réponse des stomates au CO_2 est fortement diminuée.

Ces résultats ont été soumis dans le journal Plant, Cell & Environment.

Distinct responses to ozone of abaxial and adaxial stomata in three euramerican poplar genotypes

Running title: Guard cells response for ozone tolerance

Dumont Jennifer, Cohen David, Gérard Joëlle, Jolivet Yves, Dizengremel Pierre, Le Thiec Didier.

ABSTRACT

Ozone induces stomatal sluggishness impacting photosynthesis and transpiration. Here, we seek the origin of stomatal movements change on abaxial and adaxial sides of the leaf of three euramerican poplar genotypes differing in ozone sensitivity**.** Effect of ozone on stomatal conductance of each leaf side was studied by gas exchange measurements. Ultrastructural modifications of guard cells were studied by TEM. Gene expression of ions channels and transporters involved in stomatal movements and the related element contents were quantified by qPCR and X-ray microanalyses, directly in stomata. We report a more important impact of ozone on stomatal conductance of the adaxial side of leaf correlated with higher calcium content in guard cells. The expression of H^+/Ca^{2+}-antiports (CAX1 and CAX3 homologues) and β-carbonic anhydrases (βCA1 and βCA4) was strongly decreased. Decoupling between the rate of stomatal opening and potassium concentrations in guard cells seems to settle earlier in the sensitive genotype, Robusta. The number of mitochondria in guard cells was increased with ozone. Ozone impacts stomatal movements via ion fluxes, with a specific calcium signal. The increased number of mitochondria could answer to an increasing energy request for detoxification and repair processes and may act as calcium buffer.

Key words: *Populus deltoides* x *nigra;* ozone; guard cell; abaxial and adaxial sides; gas exchange; element content; ultrastructure; gene expression.

INTRODUCTION

Forest ecosystems, covering 30% of land area of Earth (FAO, 2006), are ecologically crucial, currently constituting the most important carbon sinks. Ozone (O_3) is a tropospheric gaseous pollutant formed by photochemical reactions between sunlight and air containing nitrogen oxides emitted from human activities (with biotic and abiotic VOCs). Key player of global warming, O_3 is a greenhouse gas which causes a major impact on plants growth and yield, thus limiting the carbon sink possibilities (Sitch *et al.* 2007; ICP vegetation, 2012). O_3 causes important economic losses and represents a threat to ecosystems (Hayes *et al.* 2007; Avnery *et al.* 2011a; Ainsworth *et al.* 2012). As the tropospheric ozone concentrations are predict to increase in the coming decades, the declines in agriculture and forestry productivity will become more important and the food security will be reduced (Felzer *et al.* 2007; Van Dingenen *et al.* 2009; Avnery *et al.* 2011b).

Ozone enters the leaf through stomata and is rapidly converted in the apoplast in reactive oxygen species (ROS), leading to an oxidative stress. This results in visible and physiological damages in plants (Wittig *et al.* 2009). At leaf level, ozone impairs photosynthesis, reduces stomatal conductance and increases respiration (Heath, 1994; Dizengremel, 2001; Ainsworth *et al.* 2012). Stomatal conductance, which modulates ozone entrance in the leaf, and the capacity of ROS detoxification processes, which limits biological effect of ozone, are the two major protections involved in ozone effective flux calculation (Dizengremel *et al.* 2008; Castagna and Ranieri, 2009).

The regulation of stomatal conductance plays a key role in plant adaptation to environmental conditions changes, especially under stress. It has been shown that ozone impairs the stomatal movements, leading to perturbation of the stomatal responses to environmental parameters and sluggish stomatal behaviour. Indeed, after ozone treatment, stomata behave slower to open or close when changing light conditions, VPD or CO_2 concentrations (Paoletti, 2005; Grulke *et al.* 2007; Paoletti & Grulke, 2010; Dumont *et al.* 2013).

Stomatal movements are due to ion fluxes which require the participation of many plasma membrane and vacuolar ion channels (Pandey *et al.* 2007). Stomatal opening is driven by a membrane hyperpolarisation which leads to an accumulation of K^+ and sugars accompanied by their counter ions (Cl^-, NO^{3-} and malate^{2-}), leading to an increase of osmotic potential and water uptake in apoplasm (Fischer, 1968; Outlaw & Manchester, 1979). The closure is the

reverse situation under the control of a Ca^{2+} signal which induces anion efflux leading to membrane depolarisation and K^+ efflux.

In the present study, we examine whether the direct effect of ozone on stomatal conductance is different on each leaf side in three poplar genotypes more or less sensitive to ozone. We attempt to precise which step of stomatal movement was disturbed to explain the sluggish behaviour of stomata induced by ozone. In order to see if a particular ion flux was modified and at what channels it could be linked, we combine element content X-ray microanalyses and gene expression analyses on microdissected stomata of adaxial and abaxial sides. Finally, a possible change in the ultrastructure of guard cells was checked by microscopy techniques.

MATERIALS AND METHODS

Plant culture and exposure conditions

The plant material was grown as described in Dumont *et al.* (2013). Briefly, cuttings of three Euramerican poplar genotypes (*Populus deltoides x Populus nigra*: 'Carpaccio', 'Cima' and 'Robusta'), selected from a previous study on the basis of contrasting responses to O_3 (i.e. visible injury, growth, number of fallen leaves., data not shown), were planted and grown in a growth chamber for 5 weeks. Twenty-nine plants of each genotype were transferred for an acclimated week in eight fumigation chambers at 75/85 % relative humidity (day/night) with a 14h light period (250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ at mid leaf height from 08:00 to 22:00) and a temperature of 23/20 °C (day/night). The experiment was first conducted for 3 weeks on Carpaccio and Cima, and was later duplicated on Robusta with half of chambers. Four fumigation chambers were used for each treatment (charcoal-filtered air or fumigation of ozone at 120 nmol mol^{-1} during 13h). O_3 was produced from pure O_2 with two ozone generators (OZ500; Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and injected directly in the chambers 1 h after the beginning of the photoperiod until its end. A set of analysers (O341M; Environment S.A., Paris, France) was used to monitor O_3 concentrations. The O_3 flux was calculated and data are shown in Dumont *et al.* (2013).

Gas exchange measurements

The first fully-expanded leaf was identified for the gas exchange measurements (15th, 11th and 11th leaf from the top for Carpaccio, Cima and Robusta respectively). The stomatal

conductance (g_s) of the abaxial (lower) and adaxial (upper) sides were measured with a leaf porometer (SC-1 porometer, Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington). The measurements were carried out 3 times a week, two hours after switching on the lighting in the morning.

Sampling for microscopy analysis

At day 0, the first fully-expanded leaf at the beginning of the experiment (15th, 11th and 11th leaf from the top for Carpaccio, Cima and Robusta respectively) of four trees of each genotype was sampled. At day 11, the second fully-expanded leaf at the beginning of the experiment of four and two other trees of each genotype submitted to ozone and control treatment respectively. At day 18, the first fully-expanded leaf at the beginning of the experiment of four trees of each genotype of each treatment was sampled. A square of 1cm² was cut and immediately immersed in a fixative solution of 2.5 % glutaraldehyde and 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 at 4°C for Transmission Electron Microscopy observations. Three discs of leaves were sampled by a punch, put in an eppendorf tube and immediately flash frozen in liquid nitrogen for Scanning Electron Microscopy analysis. They were freeze-dried at -40°C for 40 h at a pressure of 10 Pa in a FreeZone Plus freeze-dryer (Labconco, Kansas City, Missouri) and then the temperature was turned back progressively to 20°C within 10 h.

Transmission electronic microscopy observations

One to 2 mm² were cut using a razor blade from the square immersed in fixative solution of 2.5% (v/v) glutaraldehyde fixative in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2. Leaf samples were infiltrated under vacuum in fixative solution and were maintained at 8°C for 4h. After being rinsed in the same phosphate buffer by 5 washes, samples were post-fixed in 2% osmium tetroxide in the rinsing buffer for 1 h at 4°C. The samples were washed in rinsing buffer 3 times of 5min followed by distilled water prior to slow dehydration through a graded acetone series. Samples were embedded in Epon 812 (EMS, Hatfield, US) according to the manufacturer’s instructions. These samples were orientated in moulds and the resin polymerised at 60°C for 48 hours. The resultant resin blocks were trimmed before ultra-thin sections (80nm) were obtained on a RMC MT7 ultramicrotome, mounted on Formwar copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate 4%. Examination of sections was performed with a transmission electron microscope (TEM) PHILIPS CM12 operating at 80kv.

Stomatal density and size of stomata

As stomata are located on both sides of *Populus* leaf, the three freeze-dried discs of each sample were divided in two pieces to study separately the two sides of each sample. They were observed under a controlled pressure scanning electron microscope (SEM) with the use of a backscattered secondary electron detector (BSD) at accelerating voltage of 15kV and magnification of 250x for stomatal density and 800x for size measurements, after being evaporated by carbon. Three and one digital images of each side of each disc of each sample at 250x and 800x were captured. The total number of stomata within an image was determined by manual counting, using the convention of excluding stomata overlapping the margins of the image, and was converted to the number of stomata per mm^2 of abaxial and adaxial leaf surface. Stomata length and width were also measured on 6 stomata by image at 800x.

X-ray microanalysis

The material to be analysed was prepared according to the method used in Le Thiec *et al.* (1994). Leaves were examined under a SEM (model 1450VP, Leo, Cambridge, UK)) at 15 kV, equipped with a dispersive energy microanalysis system (EDX, silicon drift detector of $80mm^2$, Oxford Instruments). Point and Identify Module was used to target guard cell across the freeze-dried surface at magnification 1000x. X-ray microanalyses of element content were performed on 10 guard cells of each leaf side of each disc of each sample.

Guard cells microdissection

After 18 days from the beginning of the fumigation, the first fully-expanded leaf at the beginning of the experiment (15th, 11th and 11th leaf from the top for Carpaccio, Cima and Robusta respectively) of three trees of each genotype of each treatment was sampled. The leaves were cut in half by removing the midrib and were immediately flash frozen in liquid nitrogen. They were freeze-dried at -40°C for 40 h at a pressure of 10 Pa in a FreeZone Plus freeze-dryer (Labconco, Kansas City, Missouri) and then the temperature was turned back progressively to 20°C within 10 h. Leaves were stored under vacuum in a desiccator at room temperature to avoid rehydration. Pieces of lower and upper epidermis were isolated by scraping gently the epidermis with a razor blade above a glass side. The pieces were fixed by evaporation of few drops of ethanol. Laser microdissection and pressure catapulting of guard

cells were carried out using the PALM MicroBeam system (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany). For each sample, 500 stomatal complexes were cut and catapulted in 0.2 ml tubes with adhesive cap. The room temperature was kept at 19°C and air humidity decreased to 45% to avoid rehydration and subsequent RNA degradation.

RNA extraction and cDNA amplification.

Total RNA was extracted from 500 microdissected stomata using Qiagen Micro Plus Kit (Qiagen) according to the manufacturer’s instructions. TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification (Sigma) was used for RNA reverse-transcription and cDNA amplification according to the manufacturer’s instructions. Amplification was performed on a Mx3000P QPCR System (Agilent technologies). SYBR Green (Sigma-Aldrich) and ROX (Agilent Technologies) were added to the reaction mixture to monitor amplification yield. Amplified cDNA was purified using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer’s instructions and quantified on a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo-Fischer). cDNA concentration was adjusted to 5 ng μL^{-1} for each sample.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analyses

Gene-specific primers (Supporting Information, Table S1) were designed based on the last version of *Populus Trichocarpa* genome sequence assembly on Phytozome V8.0 (Goodstein *et al.* 2012) using Primer 3 software (Untergasser *et al.* 2012). Primer specificity was checked by sequencing PCR products (Beckman Coulter Genomics). Quantitative PCR was performed using an Mx3000P QPCR System (Agilent technologies) according to the manufacturer’s recommended cycling program (10 min 95°C, 40 cycles of 5 s at 95°C, and 20 s at 58 or 60°C depending on primers). A dissociation curve was generated in order to check amplification product specificity. The reaction mixture contained 10µL Brillant III Ultrafast SYBR green QPCR Master mix, 0.3µL ROX (Agilent Technologies), 250 nM of gene-specific primers and 2.2 µL cDNA (diluted at 5 ng μL^{-1}) in each 20 µL reaction. No-template control (NTC) reactions were prepared for each gene. The Ct values were determined with the same threshold and PCR efficiency was estimated using a standard curve for each gene and each genotype. Efficiency values were taken into account in all subsequent calculations. Gene expressions were analysed using GeneNorm program (Vandesompele *et al.* 2002; Mestdagh

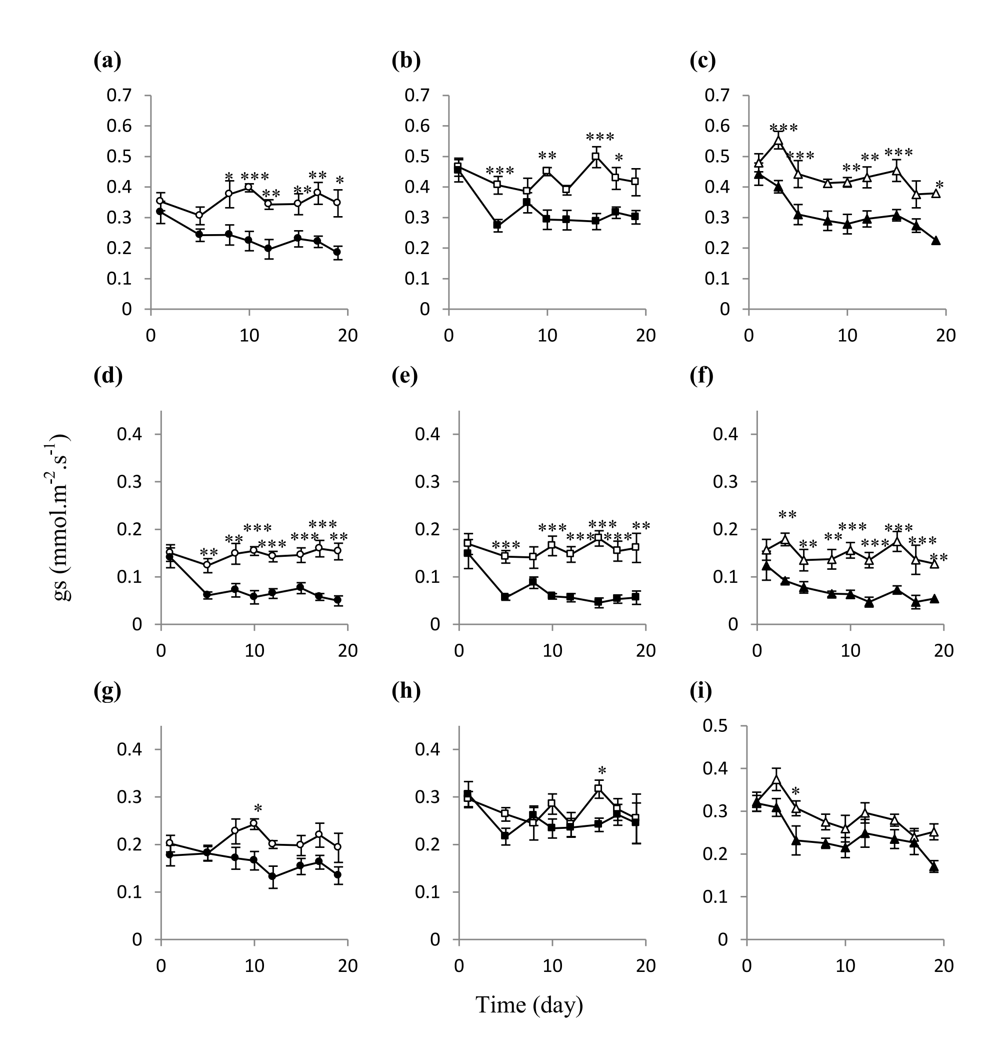


Fig. 1 Effects of ozone (control in white and ozone in black) on stomatal conductance (g_s) of leaf (**a**, **b**, **c**), of the upper side only (**d**, **e**, **f**) and the lower side only (**g**, **h**, **i**) of Carpaccio (**a**, **d**, **g**) (circles), Cima (**b**, **e**, **h**) (squares) and Robusta (**c**, **f**, **i**) (triangles). Significant differences between the two treatments are indicated by * ($p<0.05$) ** ($p<0.01$) or *** ($p<0.001$).

et al. 2009) allowing the identification of five reference genes (GOGAT6, UBL, OST26, GLR2 and KAT3V2) for gene expression normalization.

Statistical analyses

The data obtained from MEB analyses were fitted with a linear model, with treatment, side and genotype as factors. Contrast analyses were performed to test for genotype and side effect before fumigation and treatment effect for each genotype and each side. All the porometer data were modelled as linear model, with treatment and genotype as factors. Normality and homoscedasticity of standardized residuals were graphically checked using quantile-to-quantile and residual-*vs*-predicted plots. An ANOVA was used to test the differences between genotype and the treatment effect at each data for each leaf side. In case of an interaction, contrast analyses were performed to test for treatment effect within each genotype. Data were analysed using R 2.15.2 (R Core Team, 2012) and multcomp package (Hothorn *et al.* 2008). Effects were considered significant when $p < 0.05$. Cluster analysis was performed using Euclidean distance on the gene expression dataset with MeV (Saeed et al. 2003, 2006).

RESULTS

Characterization of the effect of ozone on stomatal conductance of each leaf side

Under filtered air conditions, Carpaccio has a 20% lower total stomatal conductance than Cima and Robusta (Fig. 1a,b,c). The stomatal conductance of the upper side of the leaves represents 41, 37 and 34% of the total stomatal conductance of Carpaccio, Cima and Robusta respectively (Fig. 1d,e,f).

Ozone decreases significantly the total stomatal conductance of the three genotypes (Fig. 1a,b,c). It declines by around a quarter from the fifth day of treatment in Cima (Fig. 1b) and Robusta (Fig. 1c) and from the eighth day of treatment in Carpaccio (Fig. 1a). Since the fifth day, the stomatal conductance of the upper side is halved in all three genotypes (Fig. 1d,e,f) whereas the stomatal conductance of the lower side is stable in Cima (Fig. 1h) and shows a globally non significant diminution of around 20% in Carpaccio and Robusta (Fig. 1g,i).
Observation by microscopy

On the lower side, stomatal density is more than twice as important as on the upper side with 65% of the total number of stomata on the lower side in Carpaccio and 62% in the other two

Table 1

Stomatal density and size of stomata of adaxial and abaxial sides of leaf of three poplar genotypes under ozone or charcoal filtered air treatment. (mean ± SE)

Genotype	Treatment	Leaf side	Stomatal density (stomata/mm²)	Stomata length (µm)	Stomata width (µm)
Carpaccio (C)	Control	Lower	138 ± 2	32.1 ± 0.2	17.0 ± 0.2
		Upper	76 ± 1	32.6 ± 0.3	16.7 ± 0.2
	Ozone	Lower	134 ± 2	32.5 ± 0.2	16.5 ± 0.2
		Upper	77 ± 1	32.9 ± 0.3	15.7 ± 0.2
Cima (I)	Control	Lower	138 ± 2	32.0 ± 0.2	17.5 ± 0.2
		Upper	85 ± 1	29.6 ± 0.2	15.7 ± 0.2
	Ozone	Lower	132 ± 2	32.8 ± 0.2	17.2 ± 0.2
		Upper	85 ± 1	30.9 ± 0.2	14.6 ± 0.2
Robusta (R)	Control	Lower	146 ± 1	31.6 ± 0.2	17.4 ± 0.2
		Upper	90 ± 1	30.4 ± 0.2	15.8 ± 0.2
	Ozone	Lower	144 ± 2	33.5 ± 0.2	17.9 ± 0.2
		Upper	87 ± 1	30.6 ± 0.3	15.4 ± 0.2
Statistical analyses					
Genotype effect			<0.001	<0.001	ns
Side effect	Carpaccio		<0.001	ns	ns
	Cima		<0.001	<0.001	<0.001
	Robusta		<0.001	<0.001	<0.001
Ozone effect	Carpaccio	Lower	ns	ns	ns
		Upper	ns	ns	<0.001
	Cima	Lower	ns	0.0128	ns
		Upper	ns	<0.001	<0.001
	Robusta	Lower	ns	<0.001	ns
		Upper	ns	ns	ns

genotypes (Table 1). Robusta has the highest stomatal density on both sides with 6% more stomata/mm² than the other two genotypes on the lower side and 6 and 18% more than Cima and Carpaccio respectively, on the upper side of the leaf. Stomata are equally large in all the genotypes but a little bit longer in Carpaccio than in Cima or Robusta. The size of stomata is the same between the two sides of leaf in Carpaccio but stomata are 11% larger and around 6% longer on the lower side of the other two genotypes. The ultrastructure observation with TEM revealed no difference between side and genotype (Fig. 2).

Ozone has no effect on the stomatal density on both sides of the leaves (Table 1) and only minimal effects on the size of stomata. In ozone conditions, the length of stomata in Cima increases slightly by only 4% on the upper side and 3% on the lower side and in Robusta by 6% only on the lower face. Regarding the width of stomata, it is slightly decreased only on the upper side by 6% in Carpaccio and 8% in Cima. No ultrastructural damage in guard cells was visible in response to ozone (Fig 2). Ozone has no effects on the number of chloroplasts or starch grains but it increases strongly the number of mitochondria in guard cells of both sides of leaf (Fig 2b,c).

Analyses of the element content in guard cells

In ambient condition, the calcium, chlorine, potassium and phosphorus contents are 30%, 15%, 20% and up to 25% higher respectively in the guard cells of the lower side than of the upper side of leaf in all the genotypes. The calcium content is around 25% lower in Cima than in Carpaccio and Robusta on both sides (Fig. 3a). The chlorine content in Robusta is twice as important as in Carpaccio and Cima (Fig. 3b). The potassium content is slightly lower in Carpaccio than in Cima and Robusta on both sides (Fig. 3c). The phosphorus content in guard cell of the lower side of the leaf is more than 10% higher in Cima than in the other two genotypes whereas on the upper side there is no difference.

From 11 days of treatment, ozone increases strongly the calcium content of guard cells of the upper side of leaf in the three genotypes, especially in Carpaccio (Fig. 3e). In contrast, on the lower side, the calcium content is only increased in Carpaccio and is even decreased by 10% in Robusta.

In response to ozone, from 11 days of treatment, while in Carpaccio the chlorine content in guard cells on both sides of the leaf is greatly reduced, in Robusta the opposite effect is

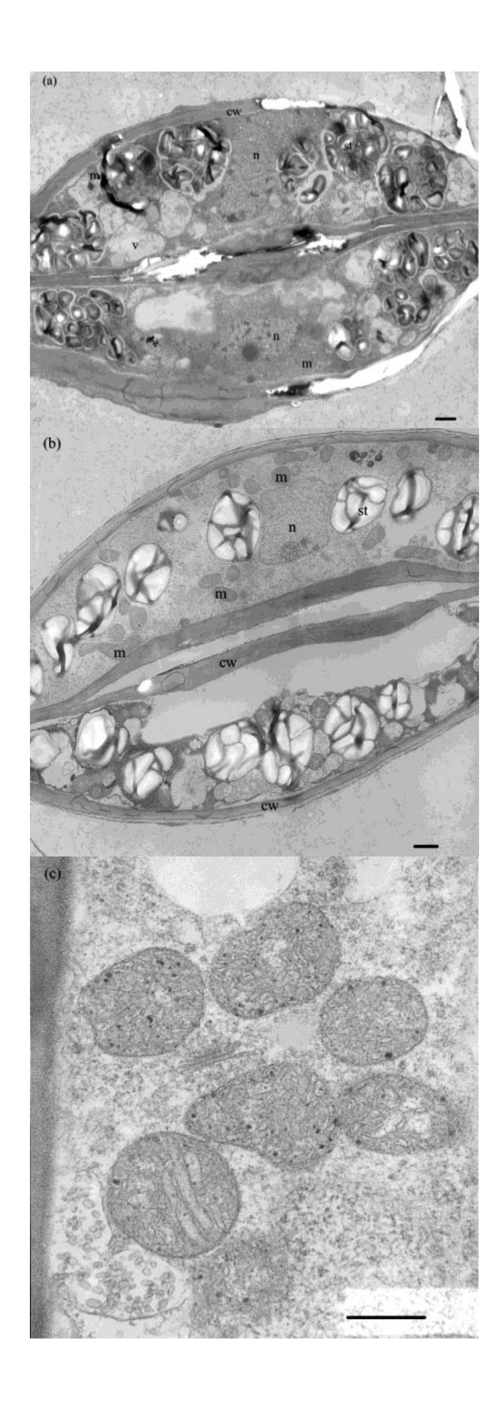


Fig. 2 General view of guard cells submitted to (**a**) control and (**b**) ozone treatments. Proliferation of mitochondria was typical in ozone treatment (**c**). Mitochondria (m), vacuoles (v), cell wall (cw) and starch grain (st) inside chloroplasts can also be seen. Bars = 1 µm

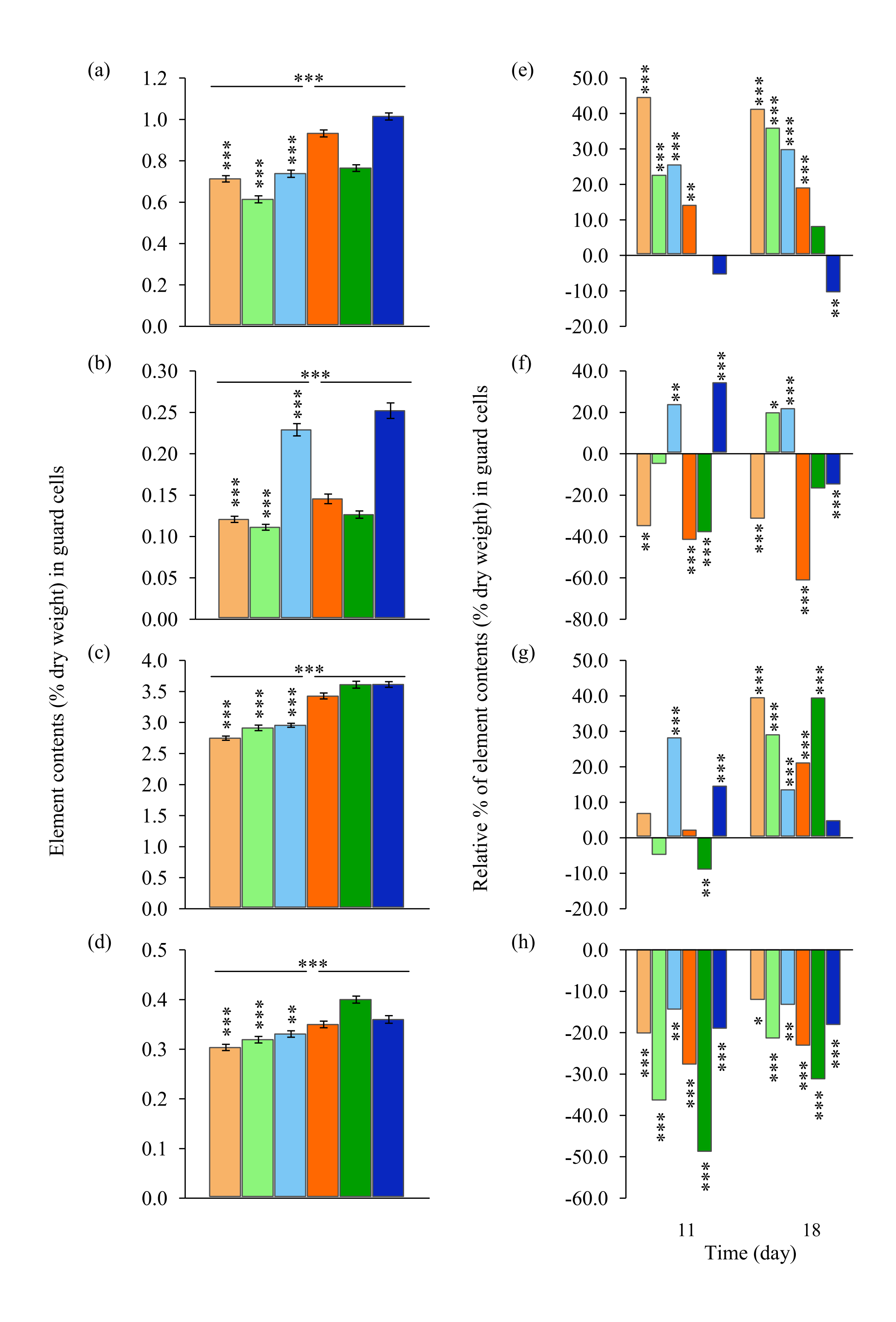


Fig. 3 Element contents (Ca (a) and (e), Cl (b) and (f), K (c) and (g), P (d) and (h)) in guard cells of the upper (pastel colour) and lower sides (bright colour) of leaves of three poplar genotypes, Carpaccio (orange), Cima (green) and Robusta (blue), before fumigation (a, b, c, d) and effect of ozone relative to control (%) after 11 and 18 days of treatment (e, f, g, h)**.** Significant differences between genotypes, sides of leaves or treatments are indicated by * (p<0.05) ** (p<0.01) or *** (p<0.001).

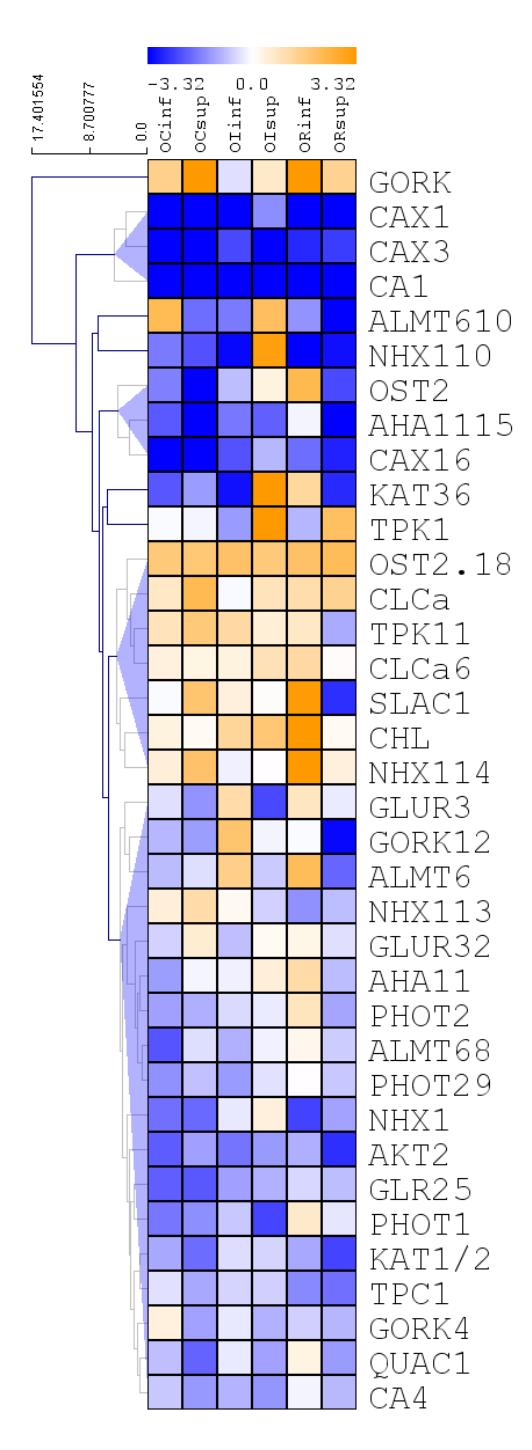


Fig. 4 Heat map representing the effects of ozone on the expression of putative genes of channels involved in stomatal movements in guard cells of the upper (Upp) and lower (Low) sides of leaves of three poplar genotypes, Carpaccio (C), Cima (I) and Robusta (R) after 18 days of treatment. Compounds are clustered using Euclidean distance.

observed (Fig. 3f). In Cima, the chlorine content is decreased only in guard cells of the lower side and is slightly increased after 18 days of treatment in guard cells of the upper side.

Ozone increases significantly potassium content in guard cells of both sides of leaves in Robusta from 11 days of treatment, whereas in Carpaccio and Cima, it is increased only from 18 days of treatment (Fig. 3g).

The phosphorus content in guard cells of both sides of the leaf is significantly decreased from 11 days of ozone treatment, especially on the lower side (Fig. 3h). The decrease is more important in Cima in which it is almost halved, than in Carpaccio or Robusta.

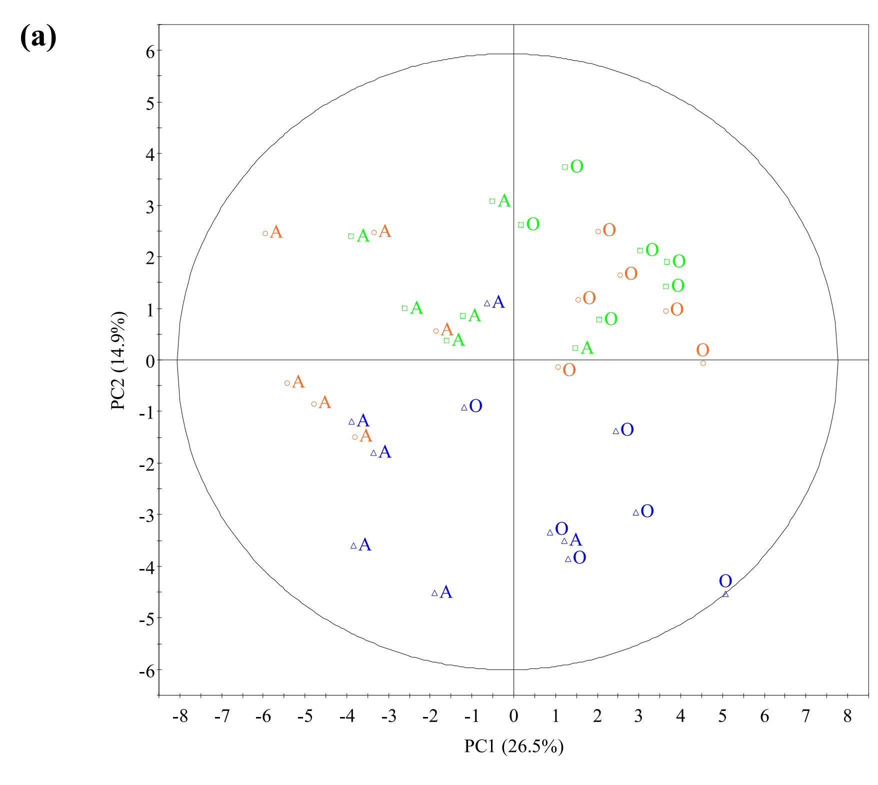
Effect of ozone on the expression in guard cells of genes involved in stomatal movements

Most of the genes involved in stomatal movements exhibit a repressed expression under ozone treatment (See Fig. S1 for complete dataset). Hierarchical clustering reveals four main groups of genes with different pattern of regulation of expression in response to ozone (Fig. 4). (i) The expression of *CAX1*, *CAX3* and *CA1* is strongly repressed (more than 10 times) in guard cells of both side of leaf in all genotypes. (ii) The expression of *AHA1115*, *CAX16* and *OST2* is quite strongly repressed in guard cells of both side of leaf in almost all the genotypes. (iii) The expression of *OST218, CLCa*, *TPK11*, *CHL*, *NHX114*, *CLCa6*, *GORK* and *SLAC1* is globally enhanced, especially for *OST218*, in guard cells of both side of leaf in almost all genotypes. (iv) The expression of genes such as *AKT2*, *GLR25*, *CA4*, *KAT1/2*, *TPC1*, *PHOT2*, *NHX1*, *QUAC1*, *PHOT1* and *GORK4* is repressed in guard cells of both side of leaf in almost all genotypes.

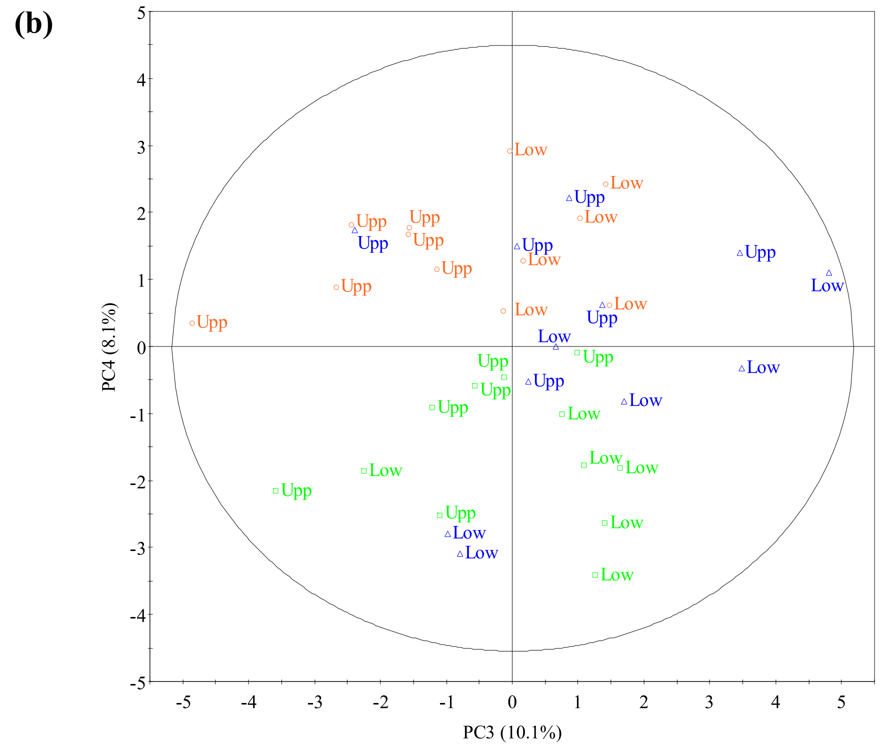
As illustrated by the PCA, the variance in gene expression in guard cells was explained by 27%, 15%, 10% and 8% by four components, PC1, PC2, PC3 and PC4, respectively (Fig. 5). PC1 shows the ozone effect by separating ambient and ozone samples. PC2 isolates the sensitive genotype, Robusta from Cima and Carpaccio (Fig. 5a). PC3 separates samples from the two sides of leaf only in Carpaccio and Cima, even if the separation is clearer in Carpaccio than in Cima (Fig. 5b). PC4 differentiates Cima from Carpaccio.

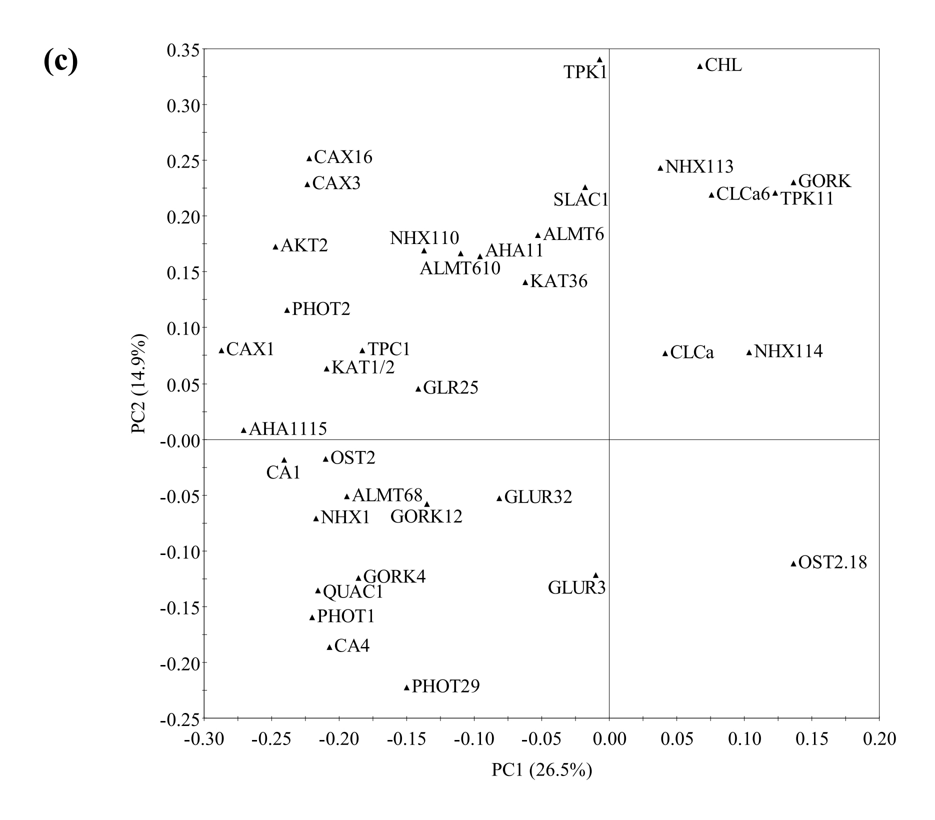
The PC1 separation is mainly due to genes shown in Fig. 4 to be regulated under ozone treatment such as *CAX1* and *CA1* or *OST218* and *TPK11* (Fig. 5c). Robusta is principally characterized by a higher expression of *PHOT29* and *CA4* and a lower expression of *CHL*, *TPK1*, *CAX16* and *CAX3* than Carpaccio and Cima. Carpaccio is essentially typified by higher expression of *NHX110* and *KAT36* (under ambient conditions) and a lower expression

(a)



(b)





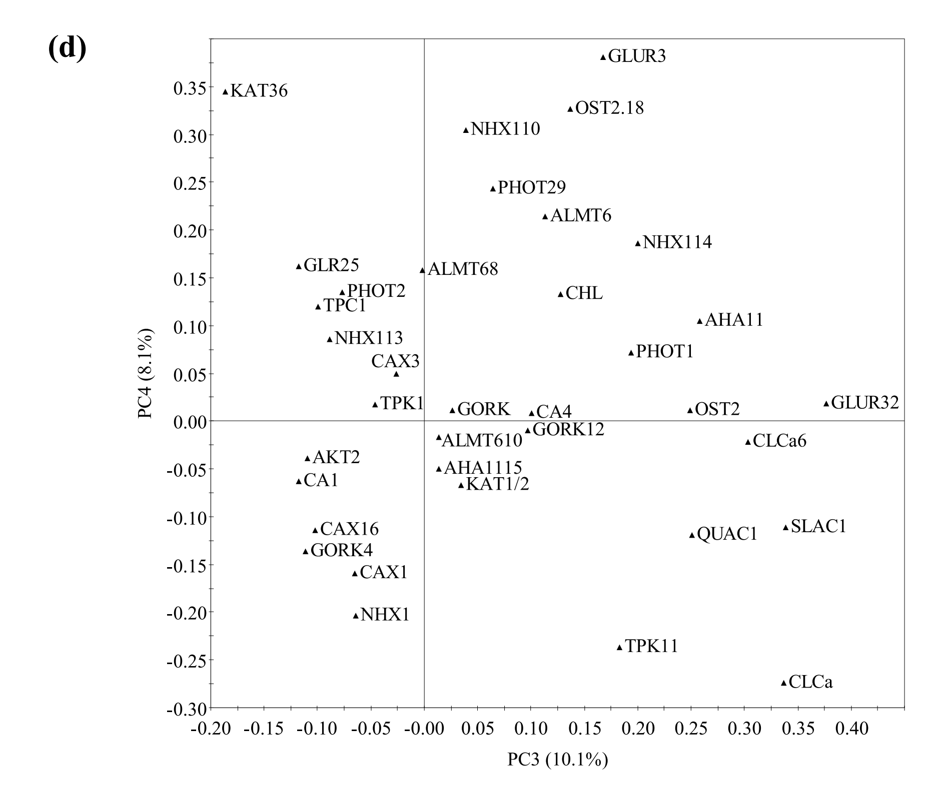


Fig. 5 Principal Component Analysis score plot of PC1 and PC2 (**a**), PC3 and PC4 (**b**) and the corresponding PCA loading plots (**c** and **d**) of the normalized gene expression in guard cells of the upper (upp) or lower (low) sides of leaves of three poplar genotypes, Carpaccio (orange circles), Cima (green squares) and Robusta (blue triangles) submitted to ambient (A) or ozone treatment (O) after 18 days.

of *CLCa* than Cima (Fig. 5d). Cima is mostly characterized by higher expression of *TPK11* and lower expression of *GLUR3*, *OST218* and *PHOT29* than Carpaccio. The differentiation between the two sides is due to some genes preferentially expressed on the lower side of leaves such as *AHA11*, *QUAC1* or *CLCa6* (except in Robusta). *GLUR32* is also more expressed on the lower side but only in ambient conditions whereas *SLAC1* and *OST2* have higher expression in ozone conditions only on the lower side.

DISCUSSION

Whatever the genotype, in response to ozone, the total stomatal conductance is lower, thus limiting ozone uptake and risk of oxidative stress, but also carbon assimilation. This reduction is almost only due to the ozone effect on the leaf upper side. Indeed, stomatal conductance on the lower side is weakly impacted, or even not at all in Cima. A deposition effect of ozone from top to bottom is not excluded, despite the air renewal in growth chamber, and could result in higher ozone flux on the leaf upper side than on the lower side. In addition, the upper side is exposed to a more intense light which may generate additional ROS production (Apel and Hirt, 2004). The lower stomatal conductance in response to ozone may be due to an amplified ROS production caused by higher ozone flux and light intensity on the upper side.

Ozone leads to sluggish stomatal responses to variation of environmental parameters. (Paoletti 2005; Paoletti and Grulke, 2010; Dumont *et al.* 2013). This effect is not caused by ultrastructural damage but is more likely due to a perturbation of the ion fluxes in guard cells. In our study, we observed a lower stomatal conductance under ozone, resulting from a smaller and/or lower opening in the morning, since the measurements have been carried out two hours after the beginning of the light phase. This is coherent with the slower opening in response to increase of blue light and the lower amplitude of opening in response to increased red light shown in response to ozone (Dumont *et al.* 2013).

Phototropins function as blue-light receptors in guard cells whereas stomatal response to red light is linked to reduction in internal CO_2 concentrations (Ci), even if a direct effect of red light on guard cell chloroplasts is not excluded (Shimazaki *et al.* 2007). A light-signal is transmitted from PHOT1 and PHOT2 to the plasma membrane H^+-ATPase which is activated. Protons efflux causes a hyperpolarisation of the membrane which drives the accumulation of K^+ by inward potassium channels, a decrease in water potential and water uptake (Schroeder *et al.* 2001). Sugars produced by photosynthesis or resulting from degradation of starch can

also accumulate in guard cells to maintain stomatal opening (Lawson, 2009). In response to ozone, we observed a decreased expression of PHOT1 and PHOT2 genes which can be linked to the slower opening to blue light (Dumont *et al.* 2013). In addition, ROS have been shown to inhibit the blue light-dependent H^+ pumping and thus, stomatal opening (Shimazaki *et al.* 2004). The observed phosphorus content decreased in guard cell by ozone treatment could participate to the inhibition of H^+-ATPase. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PtdIns(4,5)P2] is an important signal molecule involved in various processes such as guard cell movements (Jung *et al.* 2002; Lee *et al.* 2007) and especially in light-induced stomatal opening. We can hypothesize that if less phosphorus is present in the guard cell it will impact the concentration of PtdIns(4,5)P2. It has also been reported that ozone and ROS inhibit inward K^+ channels (Torsethaugen *et al. 1999*; Zhang *et al.* 2001) as confirmed here at the gene expression level with the ozone inhibition of the expression of inward K^+ channels genes.

However, as we observed a lower opening with ozone, we should notice lower potassium content in guard cell with lower counter ions concentrations and stronger calcium content. In our study, a decrease in chlorine is observed except in the sensitive genotype Robusta, and an increase in potassium, earlier in Robusta than in Carpaccio and Cima. Chlorine is not the only potassium counter ions, the anion influx may take the form of other anions, like $malate^{2-}$. X-ray microanalyses technique only gives the global element content of cells, with no distinction between subcellular compartments. The increase in potassium content in response to ozone compared to ambient treatment may be caused by potassium retention in the vacuole or in the cytosol due to a deregulation of outward potassium channels on tonopast or plasma membrane.

Indeed, there is a time effect leading to a progressive increase of potassium content in guard cell, earlier in the sensitive genotype. This progressive increase should be linked to a wider opening; it therefore needs to be counterbalanced by other factors to cause lower opening, such as a lower sugar concentration in stomata. In response to ozone, the increased calcium content is correlated with the reduced stomatal conductance on the upper side in the three genotypes and on the lower side only in Carpaccio. During stomatal opening, the cytosolic Ca^{2+} concentration decreases because of Ca^{2+} efflux and storage in organelles, especially the vacuole. Genes encoding the Ca^{2+}/H^+ vacuolar antiporters are strongly down-regulated which can lead to an impaired Ca^{2+} storage in the vacuole and higher Ca^{2+} cytosolic

concentrations. In addition, these genes are constitutively much less expressed in the sensitive genotype Robusta, which is characterized by slower stomatal opening and closure, even under ambient conditions (Dumont *et al.* 2013). In response to ozone, guard cells exhibit more mitochondria. This increase could support the higher respiration in order to provide enough energy to meet the increased needs for detoxification and repair processes as observed previously in Norway spruce (Kivimäenpää et al. 2001; 2004). They can also act as calcium buffer with a possible resting free Ca^{2+} concentration of 200 nM in mitochondria (Stael *et al.* 2012), and then be a key player in the spatiotemporal patterning of Ca^{2+} signals by rapidly removing Ca^{2+} from the cytosol (Hetherington and Brownlee, 2004). Moreover, it has recently been suggested that an influx of Ca^{2+} in mitochondria can lead to a pulse of mitochondrial membrane potential to regulate respiratory bioenergetics and counteract ROS production in response to stress (Schwarzländer *et al.* 2012). At last, the higher number of mitochondria in guard cells of O_3-treated plants could be related to the impairment of CO_2 assimilation in response to ozone and subsequently the need to oxidize the excess of reducing power initially formed in the chloroplasts by photochemical reactions (Scheibe *et al.* 2005). Generally these conditions were suitable for an higher activity of the alternative oxidase, a mitochondrial enzyme known as an antioxidant enzyme, susceptible to dampen ROS generation and for which genes were more expressed under ozone conditions (Ederli *et al.* 2006; Vanlerberghe *et al.* 2009). The increase of calcium content observed in response to ozone may be due to an alteration of the calcium efflux, or an alteration of a channel among the many involved in calcium released from cellular compartments. The initial activation of anion channel involved in stomatal closure is carried by an increase in cytosolic Ca^{2+} concentration (Schroeder *et al.* 2001). In response to ozone, if the cytosolic calcium content is maintained higher, then it can affect anion efflux and inhibits stomatal opening. The stomatal closure in response to an increased CO_2 concentration is also slowed under ozone treatment (Dumont *et al.* 2013). The CO_2 signaling leading to stomatal closure is mediated by β-carbonic anhydrases, βCA1 and βCA4 (Hu *et al.* 2010; Xue *et al.* 2011). We showed that expression of the genes coding for βCA1 and βCA4 is strongly inhibited by ozone. Ca^{2+} and HCO_3^- are involved in signal transduction to activate anion efflux. The perturbation of calcium content observed previously may have an impact on the stomatal response to CO_2 increase. However, calcium signaling is complex and involves various cellular compartments; it is therefore difficult to interpret the higher calcium content in guard cell in response to ozone with no information on the

distribution of calcium in cellular compartments (Dodd *et al.* 2010). In addition, it has been shown that ozone induces a stress-specific calcium signature leading to specific gene expression regulation and that it is not simply a ROS-induced regulation (Short *et al.* 2012).

In conclusion, it appears that ozone impacts firstly stomatal conductance of the upper side probably due to greater exposure to ROS. Modification of stomatal responses does not result from ultrastructural changes but more likely from a disturbance of ion fluxes and regulation of the expression of genes involved in signal transduction. Expression of a majority of the studied genes coding for plasma membrane and vacuolar channels is inhibited by ozone, especially the expression of genes coding for the vacuolar calcium channels (CAX1 and CAX3). Low constitutive expression of CAX1 and CAX3 genes in Robusta could be linked to its slower stomatal responses and thus, could participate to its sensitivity. Kinetics of mineral element content during 24 hours with measurements of stomatal conductance and calcium analyses in each cellular compartment could help to understand the origin of the ionic disturbance caused by ozone.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Cyndie Clément for microdissection of guard cells, Aurélie Heinis and Fabien Spicher for gas exchanges measurements, Nathalie Ningre for molecular analyses, Christophe Rose for elements microanalyses and Stéphane Martin for technical assistance. The research was supported by the French National Research Agency, ANR, project “Vulnoz", the IFR 110 EFABA and Jennifer Dumont was supported by a PhD grant from the ANR and the Lorraine Region. We thank the nursery of Guéméné Penfao for providing the cuttings.

REFERENCES

Ainsworth E.A., Yendrek C.R., Sitch S., Collins W.J. & Emberson L.D. (2012) The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 637–661.

Apel K. & Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.

Avnery S., Mauzerall D.L., Liu J. & Horowitz L.W. (2011a) Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 1. Year 2000 crop production losses and economic damage. *Atmospheric Environment* **45**, 2284–2296.

Avnery S., Mauzerall D.L., Liu J. & Horowitz L.W. (2011b) Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 2. Year 2030 potential crop production losses and economic damage under two scenarios of O_3 pollution. *Atmospheric Environment* **45**, 2297-2309.

Castagna A. & Ranieri A. (2009) Detoxification and repair process of ozone injury: From O_3 uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution* **157**, 1461-1469.

Dizengremel P. (2001) Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 729-742.

Dizengremel P., Le Thiec D., Bagard M. & Jolivet Y. (2008) Ozone risk assessment for plants: central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution* **156**, 11-15.

Dodd A.N., Kudla J. & Sanders D. (2010) The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 593-620.

Dumont J., Spicher F., Montpied P., Dizengremel P., Jolivet Y. & Le Thiec D. (2013) Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO_2 and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* x *Populus nigra* genotypes. *Environmental Pollution* **173**, 85-96.

Ederli L., Morettini R., Borgogni A., Wasternack C., Miersch O., Reale L., Ferranti F., Tosti N. & Pasqualini S. (2006) Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiology* **142**, 595-608.

FAO. 2006. Global Forest Resources Assessment (2005) Progress towards sustainable forest management. In. FAO Forestry Paper. Rome: Food and Agricultural Organisation of the United Nations.

Felzer B.S., Cronin T., Reilly J.M., Melillo J.M. & Wang X. (2007) Impacts of ozone on trees and crops. *Comptes Rendus Geoscience* **339**, 784-798.

Fischer R.A. (1968) Stomatal opening: role of potassium uptake by guard cells. *Science* **160**, 784-785.

Goodstein D.M., Shu S., Howson R., *et al.* (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* **40,** 1178-1186.

Grulke N.E., Neufeld H.S., Davison A.W., Roberts M. & Chappelka A.H. (2007) Stomatal behavior of ozone-sensitive and -insensitive coneflowers (*Rudbeckia laciniata* var. digitata) in Great Smoky Mountains National Park. *New Phytologist* **173,** 100-109.

Hayes F., Jones M.L.M., Mills G. & Ashmore M. (2007) Meta-analysis of the relative sensitivity of semi-natural vegetation species to ozone. *Environmental Pollution* **146**, 754-762.

Heath R.L. (1994) Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynthesis Research* **39,** 439-452.

Hetherington A.M. & Brownlee C. (2004) The generation of Ca^{2+} signals in plants. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 401-427.

Hothorn T., Bretz F. & Westfall P. (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal* **50**, 346-363.

Hu H., Boisson-Dernier A., Israelsson-Nordström M., Böhmer M., Xue S., Ries A., Godoski J., Kuhn J.M. & Schroeder J.I. (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators in guard cells of CO_2-controlled stomatal movements. *Nature Cell Biology* **12**, 87-93.

ICP Vegetation. (2012) Harmens H, Mills G, eds. *Ozone pollution : Impacts on carbon sequestration in Europe.* Bangor, UK, NERC/Centre for Ecology & Hydrology, 88pp.

Jung J.Y., Kim Y.W., Kwak J.M., Hwang J.U., Young J., Schroeder J.I., Hwang I. & Lee Y. (2002) Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell* **14**, 2399-2412.

Kivimäenpää M., Sutinen S., Medin E.L., Karlsson P.E. & Selldén G. (2001) Diurnal changes in microscopic structures of mesophyll cells of Norway spruce, Picea abies (L.) Karst. and the effects of ozone and drought. *Annals of Botany* **88,** 119-130.

Kivimäenpää M., Sutinen S., Medin E.L., Karlsson P.E. & Selldén G. (2003) Cell structural changes in the needles of norway spruce exposed to long-term ozone and drought. *Annals of Botany* **92,** 779-793.

Lawson T. (2009) Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist* **181**, 13-34.

Lee Y., Kim Y.W., Jeon B.W., Park K.Y., Suh S.J., Seo J., Kwak J.M., Martinoia E., Hwang I. & Lee Y. (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. *The Plant Journal* **52**, 803-816.

Le Thiec D., Rose C., Garrec J.P. Laffray D., Louguet P., Galaup S. & Loosveldt P. (1994) Alteration of element subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study. *Canadian Journal of Botany* **72**, 86-92.

Mestdagh P., Van Vlierberghe P., De Weer A., Muth D., Westermann F., Speleman F. & Vandesompele J. (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology* **10**, 61-74.

Outlaw W.H. & Manchester J. (1979) Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiology* **64**, 79-82.

Pandey S., Zhang W. & Assmann S.M. (2007) Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS* **581**, 2325-2336.

Paoletti E. (2005) Ozone slows stomatal response to light and leaf wounding in a Mediterranean evergreen broadleaf, *Arbutus unedo*. *Environmental Pollution* **134**, 439-445.

Paoletti E. & Grulke N.E. (2010) Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. *Environmental Pollution* **158**, 2664-2671.

Pei Z-M, Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E. & Schroeder J.I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.

R Core Team. (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/.

Saeed A.I., Sharov V., White J., *et al*. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**, 374-378.

Saeed A.I., Bhagabati N.K., Braisted J.C., Liang W., Sharov V., Howe E.A., Li J., Thiagarajan M., White J.A. & Quackenbush J. (2006) TM4 microarray software suite. *Methods in Enzymology* **411**, 134-93.

Scheibe R., Backhausen J.E., Emmerlich V. & Holtgrefe S. (2005) Strategies to maintain

redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1481-1489.

Schroeder J.I., Allen G., Hugouvieux V., Kwak J. & Waner D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Reviews in Plant Biology* **52**, 627-658.

Schwarzländer M., Logan D.C., Johnston I.G., Jones N.S., Meyer A.J., Fricker M.D. & Sweetlove L.J. (2012) Pulsing of membrane potential in individual mitochondria: A stress-induced mechanism to regulate respiratory bioenergetics in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**, 1188-1201.

Shimazaki K., Doi M., Assmann S.M. & Kinoshita T. (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annual Reviews in Plant Biology* **58**, 219-247.

Short E.F., North K.A., Roberts M.R., Hetherington A.M., Shirras A.D. & McAinsh M.R. (2012) A stress-specific calcium signature regulating an ozone-responsive gene expression network in Arabidopsis. *The Plant Journal* **71**, 948-961.

Sitch S., Cox P.M., Collins W.J. & Huntingford C. (2007) Indirect radiative forcing of climate change through ozone effects on the land-carbon sink. *Nature* **448**, 791-794.

Stael S., Wurzinger B., Mair A., Mehlmer N., Vothknecht U.C. & Teige M. (2012) Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *Journal of Experimental Botany* **63**, 1525-1542.

Torsethaugen G., Pell E.J. & Assmann S.M. (1999) Ozone inhibits guard cell K^+ channels implicated in stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13577-82.

Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. & Rozen SG. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces**.** *Nucleic Acids Research* **40**, 1-12.

Vandesompele J.**,** De Preter K.**,** Pattyn F.**,** Poppe B.**,** Van Roy N.**,** De Paepe A. & Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, 1-11.

Vanlerberghe G.C., Cvetkovska M. & Wang J. (2009) Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiologia Plantarum* **137**, 392-406.

Wittig V.E., Ainsworth E.A., Naidu S.L., Karnosky D.F. & Long S.P. (2009) Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Global Change Biology* **15**, 396-424.

Xue S., Hu H., Ries A., Merilo E., Kollist H. & Schroeder J.I. (2011) Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO_2 signal transduction in guard cell. *The EMBO Journal* **30**, 1645-1658.

Zhang X., Miao Y.C., An G.Y., Zhou Y., Shangguan Z.P., Gao J.F. & Song C.P. (2001) K^+ channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in Vicia guard cells. *Cell Research* **11**, 195-202.

Zhang X., Wang H,. Takemiya A., Song C., Kinoshita T. & Shimazaki K. (2004) Inhibition of blue light-dependent H^+ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H^+-ATPase in guard cell protoplasts. *Plant Physiology* **136,** 4150-4158.

Table S1

List of genes studied with their specific primers.

Gene Name	Phytozome v3 name	Primers F and R 5'- 3'	Alias	NCBI reference	Phytozome description
AHA11	Potri.012G071600	TAATCATCGTGGCAGCCAAT GGCAACAGATGACATGAAAC	Pt-HA2.1 gw1.XII.988.1 POPTR_0012s07350	Ref|XM_002318578.1|	Similar to putative plasma membrane H+ ATPase. [ORG:*Prunus persica*]; [co-ortholog (1of2) of CAB85497, At3g47950, CAB69824, At5g62670, BAC77532, T52414, CAC29435, CAC28224, CAA64406, AAQ55291, CAB69826, CAC28221, BAC77533]
AHA1115	Potri.015G066000	CGCTGGTTGTTTTCTACACT CCAACGACATTGACTACCAT	Pt-HA2.2 gw1.XV.1202.1 POPTR_0015s07710	Ref|XM_002322091.1|	Similar to putative plasma membrane H+ ATPase. [ORG:*Prunus persica*]; [co-ortholog (2of2) of CAB85497, At3g47950, CAB69824, At5g62670, BAC77532, T52414, CAC29435, CAC28224, CAA64406, AAQ55291, CAB69826, CAC28221, BAC77533]
AKT2	Potri.003G018800	GGTGTGAAGGGGAACAAGAA GATCAATCTCCCAGCTTCCA	Pt-AKT2.1 gw1.III.1210.1 POPTR_0003s01270		Similar to potassium channel protein - fava bean (fragment). [ORG:*Vicia faba*]; [ortholog of CAA71598,At4g22200,T12130]
ALMT6	Potri.015G053400	AAAGTGCTAGTGCGTTGTCT TATCGGCAGCTCAATAGGTT	gw1.82.136.1 POPTR_0015s06340	Ref|XM_002328624.1|	Similar to expressed protein in *Arabidopsis thaliana*; [ortholog of At3g18440]
ALMT68	Potri.008G118600	AGAACCTCTTGGAAGACGAA TGGCTGATTGAACACGCTAT	gw1.VIII.1158.1 POPTR_0008s11740	Ref|XM_002312350.1|	Similar to expressed protein in *Arabidopsis thaliana*; [ortholog of At2g17470,At1g25480,At1g68600]
ALMT610	Potri.010G127400	TGCGGGTTACAAGATTAGGA GCGACAGAGAACGTGATTTT	POPTR_0010s13750 fgenesh4_pm.C_LG_X000501	Ref|XM_002314840.1|	

<table>
<tr><td>CA1</td><td>Potri.001G348900</td><td>AGACTAAGTACGCTGGAGTT
CCATCATAAGGGAAGGACAT</td><td>Pt-CA1.3
POPTR_0001s34950
estExt_Genewise1_v1.C_LG_I2426</td><td>Ref|XM_002298488.1|</td><td>Similar to carbonic anhydrase isoform 1. [ORG:Pyrus pyrifolia]; [ortholog of At3g01500,S10200,1EKJ_H,AAC49785,1EKJ_C,At5g14740,AAF78507,1EKJ_G,AAD27876,1EKJ_B,AAA33652,CAA36792,1710354A,T09793,1EKJ_A,P17067,T09797,AAB65822,1EKJ_D,1EKJ_E]</td></tr>
<tr><td>CA4</td><td>Potri.010G041100</td><td>GAAGGAGGCTGTTAATGTGT
GTTCCCTTGACAAAGTCGTA</td><td>POPTR_0010s05080
estExt_fgenesh4_kg.C_LG_X0015</td><td>Ref|XM_002314581.1|</td><td></td></tr>
<tr><td>CAX1</td><td>Potri.016G115500</td><td>TGTTATTGGGGCGTGCTTTT
AAGCTGCAATGACTGATCCA</td><td>Pt-CAX3.2
POPTR_0016s12290
grail3.0025015501</td><td></td><td>Similar to Ca2+/H+ exchanger. [ORG:Vigna radiata]; [co-ortholog (1of2) of At5g01490, At3g51860, BAA25753, At2g38170, T07821]</td></tr>
<tr><td>CAX3</td><td>Potri.001G251200</td><td>GAGTGAGCAGCATTGTTATG
AATCCTATCACCGCCTTTTC</td><td>POPTR_0001s25830</td><td>Ref|XM_002298278.1|</td><td></td></tr>
<tr><td>CAX16</td><td>Potri.006G099900</td><td>TCCCTTCAAAGCTGAAATGC
TGCCATATGCCACCTTCTAT</td><td>Pt-CAX3.1
POPTR_0006s10080
grail3.0023029601</td><td></td><td>Similar to Ca2+/H+ exchanger. [ORG:Vigna radiata]; [co-ortholog (2of2) of At5g01490, At3g51860, BAA25753, At2g38170, T07821]</td></tr>
<tr><td>CHL</td><td>Potri.003G111500</td><td>AGTTGCCAGAAGAGTGCTTA
TCTTTTCAGTGAGTGCTGCT</td><td>Pt-PPNRT1.2
eugene3.00030833
POPTR_0003s11080</td><td>Ref|XM_002303476.1|</td><td>Similar to nitrate transporter. [ORG:Prunus persica]; [co-ortholog (1of2) of CAD32549, BAC81420, At1g12110, BAD22820, CAD33927]</td></tr>
<tr><td>CLCa</td><td>Potri.001G331700</td><td>TCTTGCTTGCCTTTCCTCAT
CCGCTGTAATCACTCAACTT</td><td>Pt-CLC.5
POPTR_0001s33920
estExt_fgenesh4_pm.C_LG_I0924</td><td>Ref|XM_002300065.1|</td><td>Similar to Chloride channel protein CLC-a (AtCLC-a).; [ortholog of At3g27170,At5g40890]</td></tr>
<tr><td>CLCa6</td><td>Potri.006G064000</td><td>CCCTGTTGTGGGTATATTGA</td><td>POPTR_0006s06280</td><td>Ref|XM_002330988.1|</td><td>Similar to chloride channel-like (CLC) protein;</td></tr>
</table>

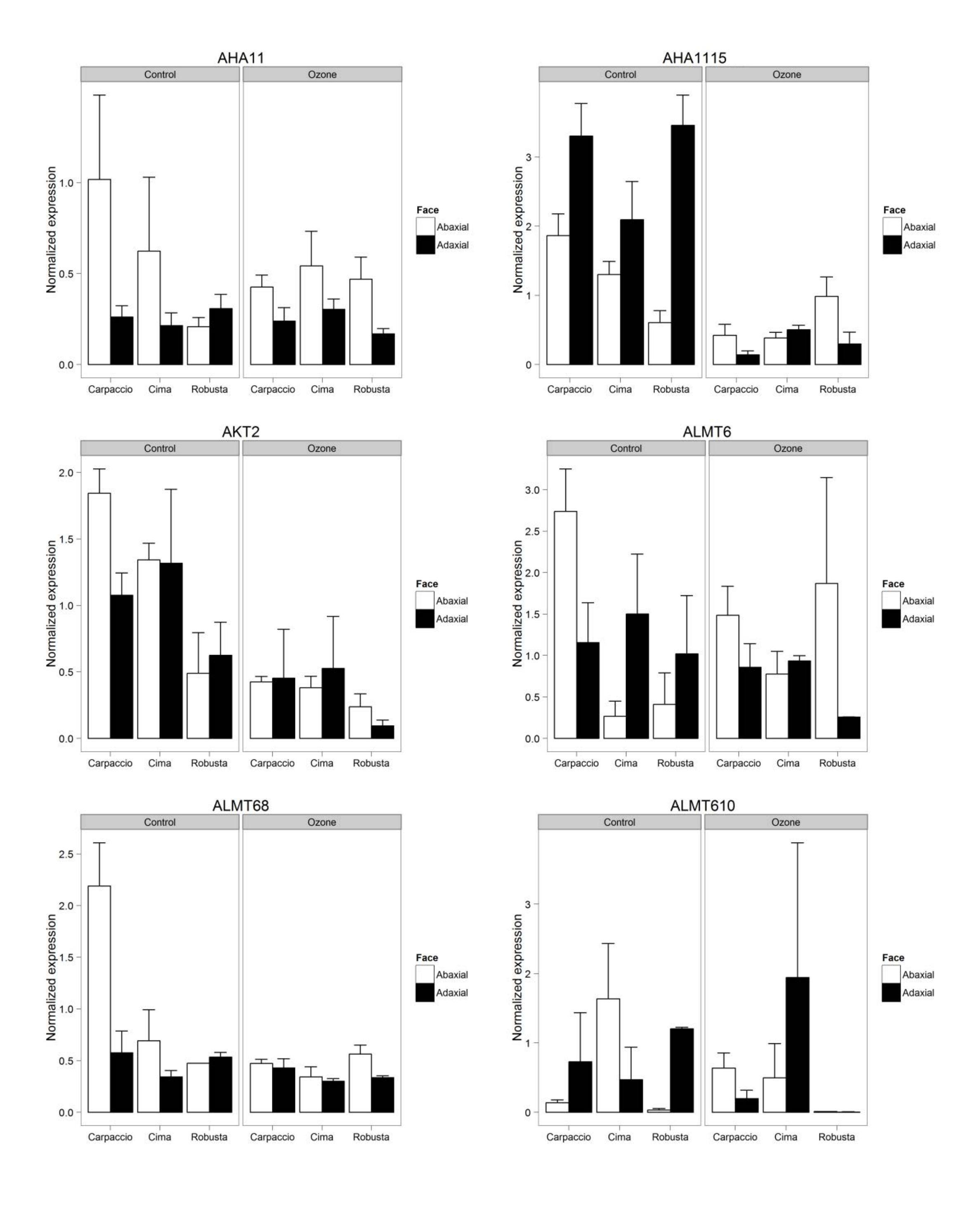
		TTGACTCCAACGCTCTAGAA	estExt_fgenesh4_pm.C_1520034		putative; similar to CLC-c; similar to At5g49890 (*Arabidopsis thaliana*) and chloride channel protein ClC-1 - *Nicotiana tabacum*; similar to PIR:T02939; [co-ortholog (1of2) of At5g33280]
GLR2					
GLR25	Potri.005G102700	GGCTTATGAGAAGTGCATGT CAAGCAAGCAAGCTATTCCA	Pt-GLR3.5 eugene3.00050411 POPTR_0005s10570	Ref|XM_002306400.1|	Glutamate receptor family protein; similar to plant glutamate receptor family; similar to PMID:11379626; similar to member of Putative ligand-gated ion channel subunit family; [co-ortholog (1of2) of At3g51480]
GLUR3	Potri.014G152200	TGGGCCAAGAGTTCACAAAA TCTCCATGTGTCAGCCATTT	POPTR_0014s15030	Ref|XM_002321087.1|	
GLUR32	Potri.002G230000	GCTCAACATCGCAGAATCTA ACAATTGGAGGCAGACAAGA	Pt-GLUR3.3 eugene3.00002112 POPTR_0002s23060	Ref|XM_002301591.1|	Similar to Glutamate receptor 3.5 precursor (Ligand-gated ion channel 3.5) (Ionotropic glutamate receptor GLR6).; [co-ortholog (2of3) of At1g05200, At2g32390]
GOGAT6	Potri.006G038400	TTATCGGGGAAACAGAATGC TCTCTAACAATGGGGATGCT	Pt-GLU1.2 estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VI0304 POPTR_0006s03660	Ref|XM_002308848.1|	Similar to ferredoxin-dependent glutamate synthase. [ORG:*Securigera parviflora*]; [co-ortholog (1 of 2) of T06228, AAP33664, At2g41220, At5g04140]
GORK4	Potri.004G083300	ATGGGGTGCAAAAGAACAGA AGAACCATCTGGAAGCTGTA	Pt-SKOR.3 gw1.IV.3720.1 POPTR_0004s08170	Ref|XM_002305858.1|	Similar to Potassium channel SKOR (Stelar K(+) outward rectifying channel).; [co-ortholog (2of4) of At3g02850]
GORK12	Potri.012G043000	GAACACCTTTGCACATTGCT TTCCACCAATACGAGCTTCA	Pt-SKOR.2 eugene3.00120017	Ref|XM_002317669.1|	Similar to Potassium channel SKOR (Stelar K(+) outward rectifying channel).; [co-ortholog

<table>
<tr><td></td><td></td><td></td><td>POPTR_0012s04000</td><td></td><td>(3of4) of At3g02850]</td></tr>
<tr><td>GORK</td><td>Potri.017G135400</td><td>GATTGATGGTGGCCAGAAGT
GCATGCAGCAGGAACAAGAA</td><td>Pt-SKOR.4
POPTR_0017s02430
fgenesh4_pm.C_LG_II001048</td><td>Ref|XM_002301629.1|</td><td>Similar to Potassium channel SKOR (Stelar K(+) outward rectifying channel).; [co-ortholog (1of4) of At3g02850]</td></tr>
<tr><td>KAT1/2</td><td>Potri.004G132200</td><td>TCACTATCCACATGCAGCTT
GGCAATTCTGAGCAACTCTT</td><td>Pt-KAT1.1
gw1.IV.4469.1
POPTR_0004s13910</td><td>Ref|XM_002305301.1|</td><td>Similar to K+ channel protein. [ORG:Populus tremula x Populus tremuloides]; [ortholog of At5g46240,At4g18290,CAC87141]</td></tr>
<tr><td>KAT3</td><td>Potri.018G035500</td><td>CATTCCATCATCAGCCTACA
CATGTATTTCCCTCCCTTGT</td><td>POPTR_0018s00970</td><td>Ref|XM_002324221.1|</td><td></td></tr>
<tr><td>KAT36</td><td>Potri.006G245000</td><td>CCAGAAGGATTGAGAAAGCA
GCAACGATGCTATGGAAAAG</td><td>Pt-ATKC1.4
POPTR_0006s26140
fgenesh4_pm.C_LG_VI000755</td><td>Ref|XM_002308592.1|
Ref|XM_002333915.1|
Ref|XM_002333916.1|</td><td>Similar to ARABIDOPSIS THALIANA K+ RECTIFYING CHANNEL; similar to POTASSIUM CHANNEL 1; [co-ortholog (2of5) of At4g32650]</td></tr>
<tr><td>NHX1</td><td>Potri.005G045100</td><td>ACCCCAACACACACTGTTCA
TTCGGAGAATTGCGCTCTGT</td><td>Pt-NHX2.1
eugene3.00700146
POPTR_0005s04660</td><td>Ref|XM_002328349.1|</td><td>Similar to Na+/H+ antiporter. [ORG:Medicago sativa]; [co-ortholog (1of2) of At5g27150, At3g05030, AAS84487]</td></tr>
<tr><td>NHX110</td><td>Potri.010G031500</td><td>CAATCGGCTTTTGGTGTGAA
TTGACAAGCCATAGCCACAA</td><td>Pt-NHX1.1
POPTR_0010s03270
fgenesh4_pm.C_LG_X000073</td><td>Ref|XM_002315496.1|</td><td>Similar to Na+/H+ antiporter. [ORG:Populus euphratica]; [co-ortholog (1of2) of CAH69218]</td></tr>
<tr><td>NHX113</td><td>Potri.013G031700</td><td>AAGCCCTGCTACATCTTTGA
GCTAACATACATCGCAAAGC</td><td>Pt-NHX2.2
eugene3.00130299
POPTR_0013s03220</td><td>Ref|XM_002319556.1|</td><td>Similar to Na+/H+ antiporter. [ORG:Medicago sativa]; [co-ortholog (2of2) of At5g27150, At3g05030, AAS84487]</td></tr>
<tr><td>NHX114</td><td>Potri.014G134900</td><td>GCCAATGGACAAGATTCAGA
AATTTCCGCCACAAGTGATG</td><td>Pt-NHX1.2
eugene3.00140792
POPTR_0014s12940</td><td>Ref|XM_002320330.1|</td><td>Similar to Na+/H+ antiporter. [ORG:Populus euphratica]; [co-ortholog (2of2) of CAH69218]</td></tr>
</table>

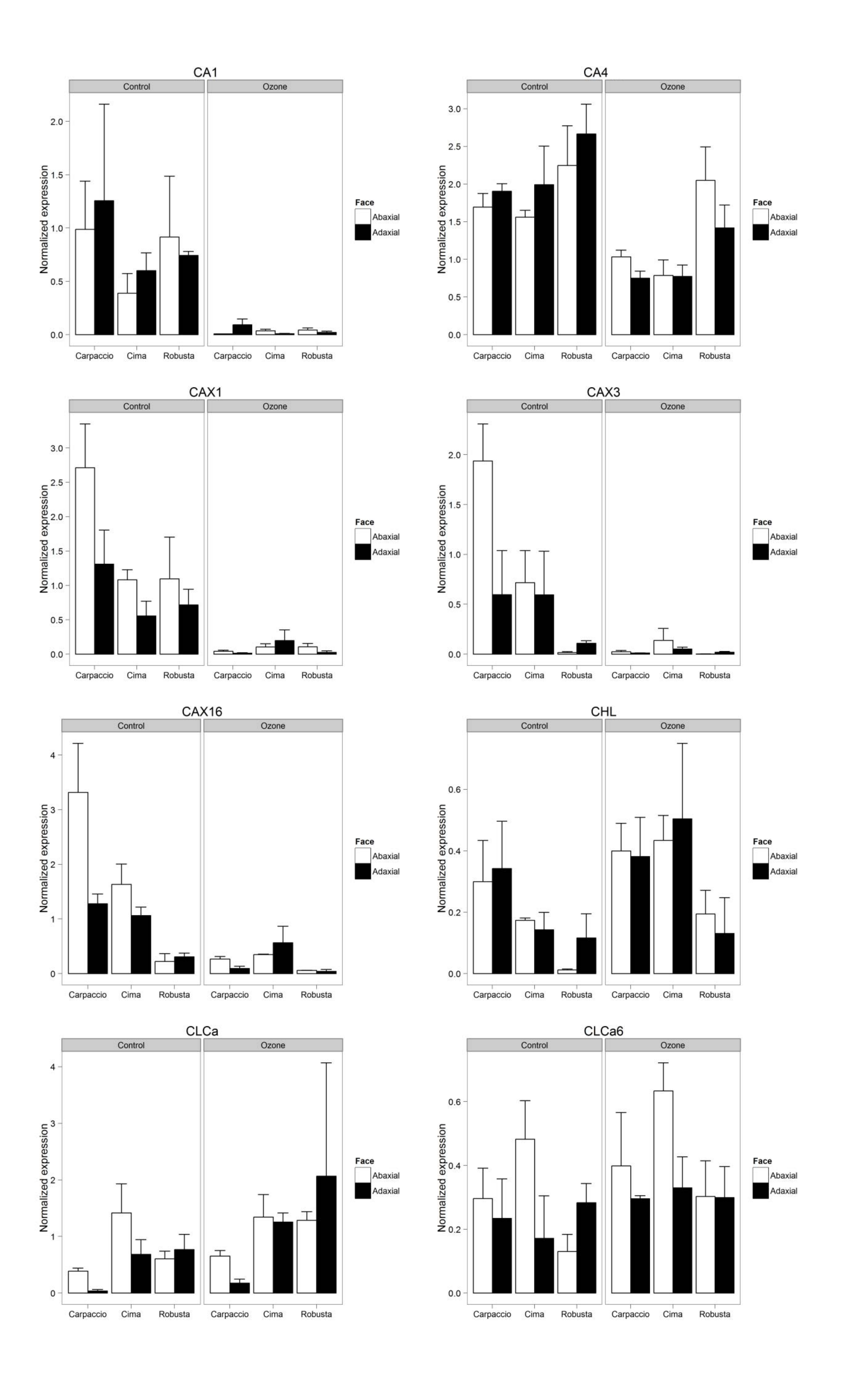
OST26	Potri.006G275000	AGAAGGCTGGAAGCGAAAAT TAATCCCCTCTGGGTTTGAA	Pt-VHA1.2 POPTR_0006s28990 estExt_fgenesh4_pg.C_1470038	Ref|XM_002330768.1|	Similar to H+-ATPase. [ORG:*Medicago truncatula*]; [co-ortholog (1of2) of At2g24520, AAQ19041, AAA81349, CAB85496, AAC43034, CAA59799, AAQ19038]
OST218	Potri.018G006000	ATGTGGAATCAGTGGTGAAG CCTTCTTCGTCGTCATATAG	Pt-VHA1.1 POPTR_0018s03700 estExt_Genewise1_v1.C_LG_XVIII2227		Similar to H+-ATPase. [ORG:*Medicago truncatula*]; [co-ortholog (2of2) of At2g24520, AAQ19041, AAA81349, CAB85496, AAC43034, CAA59799, AAQ19038]
PHOT1	Potri.001G342000	TCCATTCTTCAAGGGTGTCA TGTCTGTAGATCCTGCATTC	Pt-PHOT1.1 gw1.I.2683.1 POPTR_0001s35680	Ref|XM_002298523.1|	Similar to protein kinase homolog - garden pea. [ORG:*Pisum sativum*]; [ortholog of T06809,AAQ63177,E41139,At3g45780,AAB41023,D41139]
PHOT2	Potri.004G209700	GGATCAAAAGCTGGTGCTAA GCCTTCGGATCTTTTCCAAT	POPTR_0004s21940	Ref|XM_002328251.1| Ref|XM_002328252.1|	
PHOT29	Potri.009G170600	CCGTGACTTGAAGCCTGAAA GTGGTTGGCTCCTTGATCTT	POPTR_0009s17170 POPTR_0009s17190 POPTR_0009s17180		
QUAC1	Potri.001G144300	TTTAAACCCGGAGATGAGGT GTATAGCCCGATATCCATAG	POPTR_0001s02700	Ref|XM_002326677.1|	
SLAC1	Potri.001G114300	AATGTCCCTGGTGTTCTAAG CCAAACAAAAGCGTGCAGAA	POPTR_0001s08280		
TPC1	Potri.013G131100	CAAGGAAGGAAGCAACTCAA GCATTGGAGCATTCTGGTTT	Pt-CCH1.1 POPTR_0013s13470 estExt_fgenesh4_pm.C_1420009	Ref|XM_002330597.1|	Similar to calcium channel 1; [ortholog of At4g03560]
TPK1	Potri.016G007200	GAAATGTCACAGCCTCAGAT	POPTR_0016s00890	Ref|XM_002323090.1|	Similar to pulvinus outward-rectifying channel

		CTTATCTTCCCCATCTCCTT	fgenesh4_pm.C_LG_XVI000011		for potassium SPOCK1. [ORG:*Samanea saman*]; [co-ortholog (1of4) of AAD16279]
TPK11	Potri.001G366800	ATGGGAAAGATCAGCGAAGA GATGGTTCAGTCACTTGTGT	gw1.I.4741.1 POPTR_0001s37550	Ref|XM_002298826.1|	Similar to pulvinus outward-rectifying channel for potassium SPOCK1. [ORG:*Samanea saman*]; [co-ortholog (3of4) of AAD16279]
UBL	Potri.005G198700	TGAGGCTTAGGGGAGGAACT TGTAGTCGCGAGCTGTCTTG	Pt-SUBI.4 estExt_Genewise1_v1.C_LG_V0494 POPTR_0005s22060	Ref|XM_002306689.1|	Similar to polyubiquitin. [ORG:*Cucumis melo*]; [co-ortholog (10 of 11) of CAA10056, CAA38256, P03993, BAA76429, BAA05670, AAQ08998, AAL33551, AAF31707, BAA85750, AAP31578, AAF70460, AAQ08999, BAA05085, CAA06197]

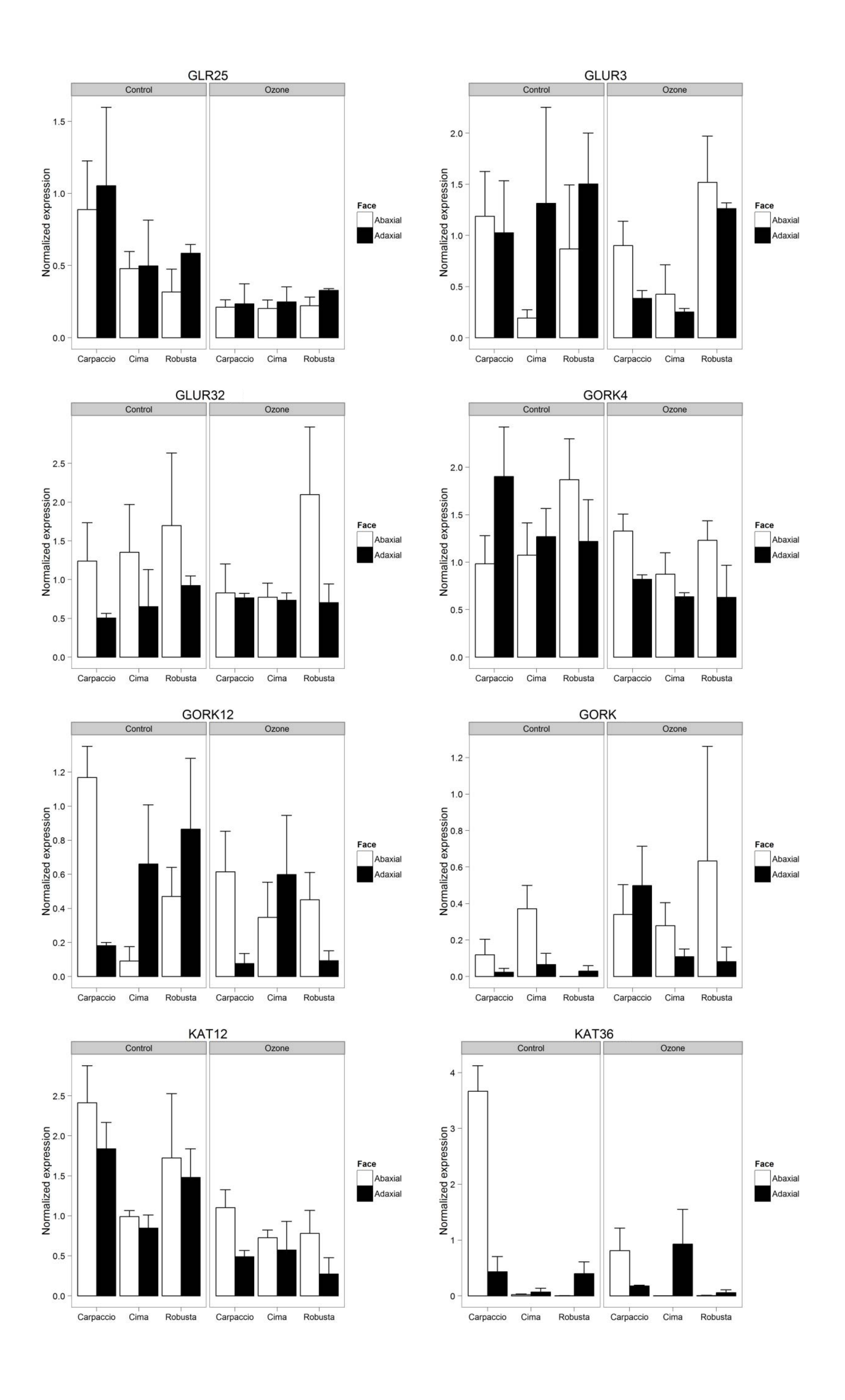
Figure S1

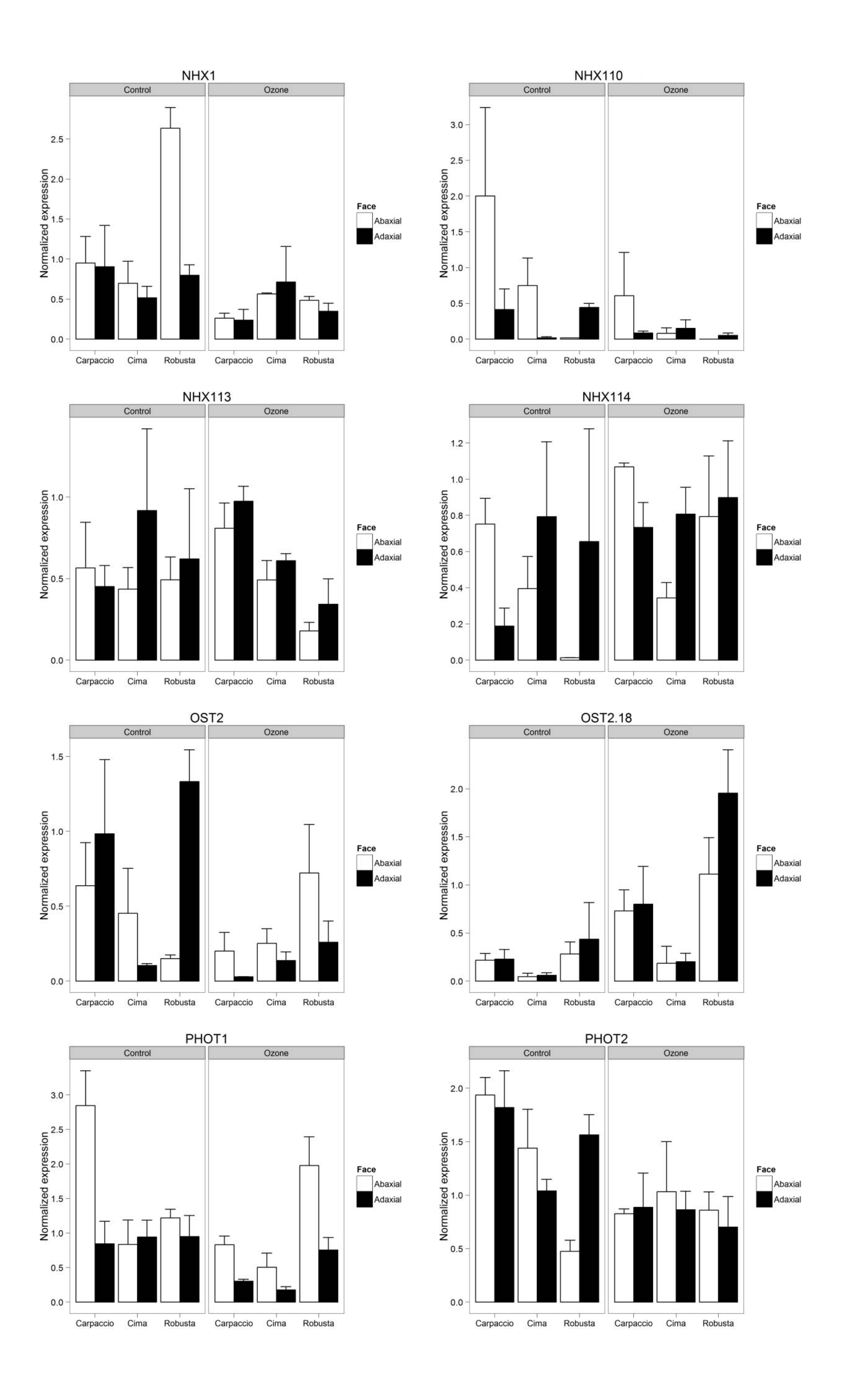


AHA11
Control
Ozone
Normalized expression
Face
Abaxial
Adaxial
Carpaccio
Cima
Robusta
AHA1115
AKT2
ALMT6
ALMT68
ALMT610

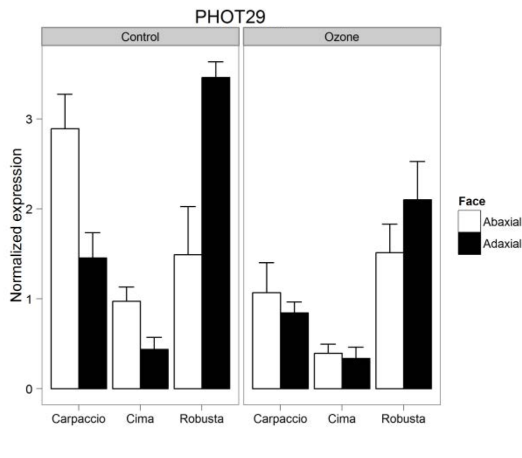


CA1
CA4
CAX1
CAX3
CAX16
CHL
CLCa
CLCa6
Control
Ozone
Normalized expression
Carpaccio
Cima
Robusta
Face
Abaxial
Adaxial

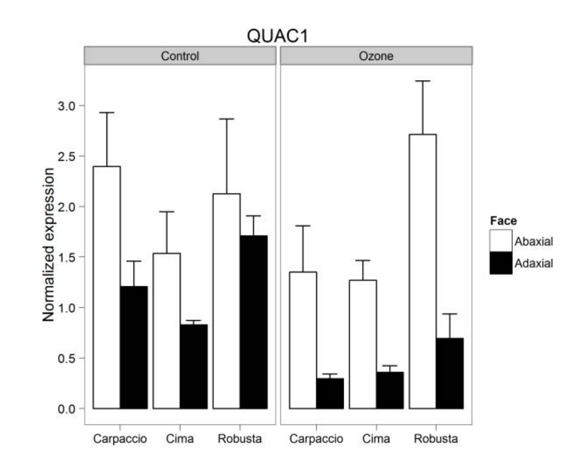

GLR25
GLUR3
GLUR32
GORK4
GORK12
GORK
KAT12
KAT36
Control
Ozone
Normalized expression
Carpaccio
Cima
Robusta
Face
Abaxial
Adaxial



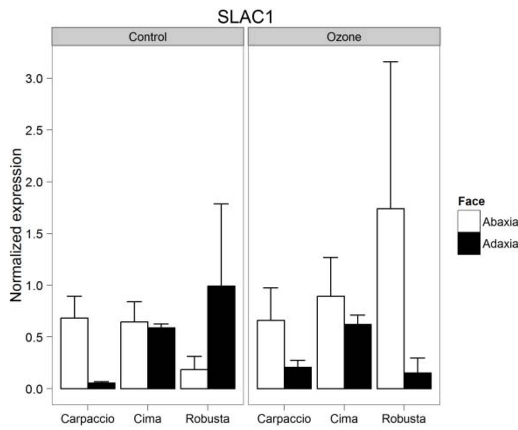
NHX1
NHX110
NHX113
NHX114
OST2
OST2.18
PHOT1
PHOT2
Control
Ozone
Normalized expression
Carpaccio
Cima
Robusta
Face
Abaxial
Adaxial



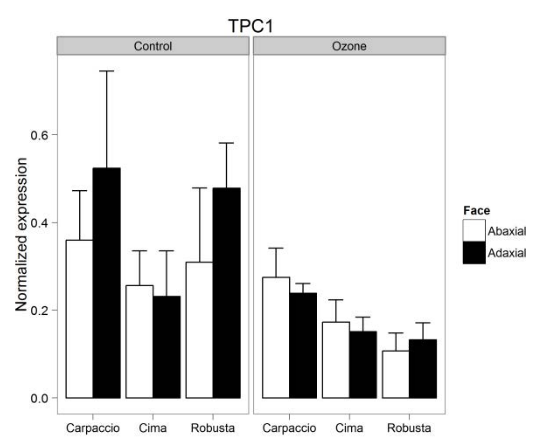
PHOT29
Control
Ozone
Normalized expression
Carpaccio
Cima
Robusta
Face
Abaxial
Adaxial



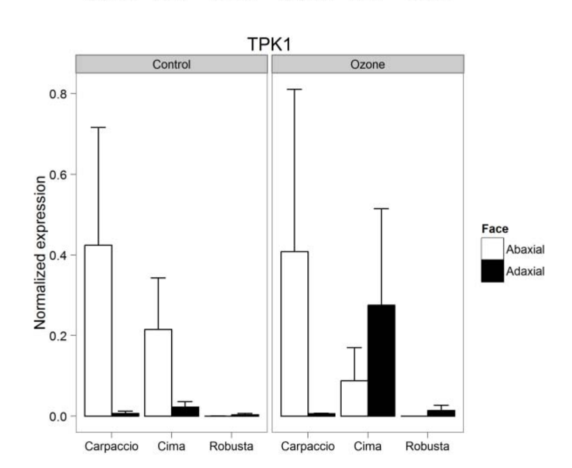
QUAC1
Control
Ozone
Normalized expression
Carpaccio
Cima
Robusta
Face
Abaxial
Adaxial



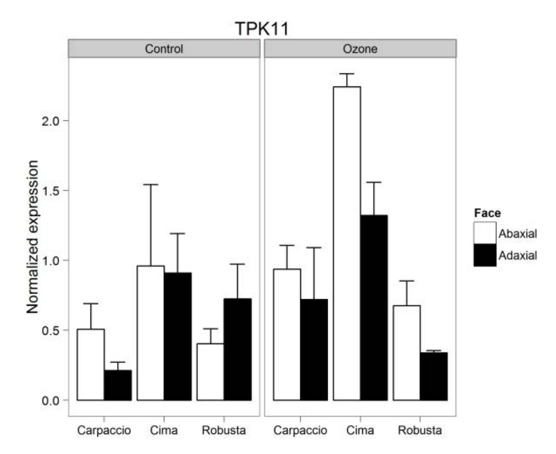
SLAC1
Control
Ozone
Normalized expression
Carpaccio
Cima
Robusta
Face
Abaxial
Adaxial



TPC1
Control
Ozone
Normalized expression
Carpaccio
Cima
Robusta
Face
Abaxial
Adaxial



TPK1
Control
Ozone
Normalized expression
Carpaccio
Cima
Robusta
Face
Abaxial
Adaxial



TPK11
Control
Ozone
Normalized expression
Carpaccio
Cima
Robusta
Face
Abaxial
Adaxial

II. DETOXICATION FOLIAIRE

1. EFFETS DE L'OZONE SUR LES VOIES DE SYNTHESE DE L'ASCORBATE ET DU GLUTATHION EN RELATION AVEC LES CONTENUS EN ACIDE AMINES CHEZ TROIS GENOTYPES DE PEUPLIER : UNE COMBINAISON D'APPROCHES MOLECULAIRE ET METABOLOMIQUE

Nous avons vu que la régulation des mouvements stomatiques permet de limiter l'entrée d'ozone dans les feuilles, notamment par l'épiderme supérieur. Néanmoins, l'ozone altère les mouvements stomatiques ce qui peut induire des pertes en eau et une diminution de l'assimilation. L'ozone parvenant à entrer dans la feuille va créer un stress oxydatif par la formation de radicaux libres oxygénés (ROS) dans l'apoplaste. Un processus de détoxication combiné à un processus de réparation doit permettre de lutter contre les effets délétères de ces ROS. Une des principales voies de détoxication est la voie d'Halliwell-Asada-Foyer dont l'ascorbate et le glutathion sont les acteurs majeurs. De plus, l'ascorbate étant présent dans l'apoplaste, c'est le premier à pouvoir s'opposer aux effets induits par les ROS.

Cette étude vise à mettre en évidence l'effet de l'ozone sur les concentrations en ascorbate et en glutathion, sous leurs différentes formes, oxydée et réduite. Afin de ne pas être débordé par les ROS, le pouvoir réducteur, dont l'ascorbate et le glutathion sont deux acteurs majeurs, doit être maintenu grâce aux processus de régénération et de synthèse *de novo*. Nous avons étudié l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ascorbate et du glutathion, en complément de l'analyse des teneurs en acides aminés utilisés dans ces voies. Les conclusions suivantes ont pu être tirées :

- l'ozone engendre une augmentation des concentrations en ascorbate. Chez le génotype sensible, cette augmentation n'est due qu'à une hausse de la forme oxydée, tandis que chez les autres génotypes, c'est une hausse de la forme réduite qui est observée.

- l'expression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de l'ascorbate est globalement induite par l'ozone et la régulation semble s'effectuer grâce au gène *VTC2* principalement.
- l'ozone entraîne une augmentation des concentrations en glutathion et le ratio redox est maintenu. Cette augmentation est plus intense chez le génotype le plus résistant.
- l'expression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse du glutathion est globalement induite par l'ozone et la régulation semble s'effectuer grâce aux gènes codant pour les enzymes GSH1 et GSH2 principalement. Chez le génotype le plus résistant (Carpaccio), une très forte induction de l'expression d'un gène codant pour la thréonine aldolase pourrait permettre la synthèse de glycine à partir de la thréonine.
- l'ozone provoque une remobilisation des acides aminés vers la synthèse d'antioxydants et de nouvelles sources d'énergie. Nous observons une hausse de la cystéine disponible pour la synthèse de glutathion, une hausse des acides aminés aromatiques utilisés pour la synthèse des phénols, des flavonoïdes, et une hausse de la putrescine acteur de la détoxication induisant une augmentation de l'activité de certaines enzymes antioxydantes, surtout chez le génotype le plus résistant.

Ces résultats ont été soumis dans Plos One

Ozone effects on ascorbate and glutathione biosynthesis pathways in relation with amino acid contents on three poplar genotypes

Running title: Detoxification and amino acids in ozone tolerance

Jennifer Dumont, Sarita Keski-Saari, Markku Keinänen, David Cohen, Nathalie Ningre, Sari Kontunen-Soppela, Pierre Baldet, Yves Gibon, Pierre Dizengremel, Marie-Noëlle Vaultier, Yves Jolivet, Elina Oksanen & Didier Le Thiec.

Abstract

Ozone is an air pollutant causing oxidative stress by generation of reactive oxygen species (ROS) within leaf. The capacity to detoxify ROS and repair ROS-induced damages may contribute to define ozone tolerance. Ascorbate and glutathione are known to be key players of detoxification. Ozone effects on their biosynthesis and on amino acid metabolism were investigated in three euramerican poplar genotypes (*Populus deltoides x Populus nigra*) differing in ozone sensitivity. Total ascorbate and glutathione contents were increased in response to ozone in all genotypes. Reduced ascorbate (ASA) increased in the two least sensitive genotypes (Carpaccio and Cima), whereas the most sensitive genotype (Robusta) seemed unable to regenerate ASA from oxidized ascorbate (DHA). Increased ascorbate (ASA + DHA) content correlated with the increase in gene expression on its biosynthetic pathway, especially VTC2. Increased cysteine availability combined to increased expression of glutathione synthetase (GSH1) and gamma-glutamylcysteine synthetase (GSH2) genes allow higher glutathione biosynthesis in response to ozone, particularly in Carpaccio. In addition, ozone caused a remobilization of amino acids with a decrease of total amino acids pool, an increase of cystein and putrescine, especially in Carpaccio. In addition, the expression of gene encoding threonine aldolase was strongly induced, only in the most resistant genotype,

Carpaccio. ASA level could partly explain the sensitivity to ozone for Robusta but not for Cima. ASA level is not sufficient to account for ozone tolerance in poplar, but that a sum of different factors is necessary including glutathione content.

Introduction

Tropospheric ozone (O_3) is a powerful oxidizing agent which acts as a phytotoxin [1]. Its concentrations are still increasing and thus, represent a significant threat to earth life with a decrease of vegetation growth, reduced productivity and economic losses [2], [3]. In France, the usual ozone concentrations are lower than 60 nmol mol^{-1}, but concentrations greater than 120 nmol mol^{-1} are frequently recorded on several days each year [4], [5]. The current O_3 concentrations lead to economic losses due to a decline in forestry and agriculture productivity [6], [7], [8]. Indeed, in addition to a decrease of stomatal conductance and net CO_2 assimilation by O_3, a direct effect of O_3 is observed on primary metabolism [9], [10]. This can reduce energy resources, leading to slower growth and loss of biomass [11], [12], [13].

Ozone enters the leaves through stomata and is degraded in the apoplast generating reactive oxygen species (ROS) [14]. These chemically reactive molecules can destroy or modify several cellular components like proteins, lipids or nucleic acids [15], but in parallel, they have a key role in cell signalling [16], [17], [18]. A balance between ROS production and detoxification must be maintained by the two ways of plant defence against O_3, *i.e.* regulation of stomatal conductance and detoxification of ROS generated during O_3 degradation [14], [19], [20]. Differences in sensitivity to ozone between species or genotypes may be related to one of these two processes [21], [22], [23].

A constitutive detoxification system is already operative at the entrance of O_3 in the leaf. The pool of reduced ascorbate (ASA) in the apoplast is the first line of defence to avoid ROS to reach the plasmalemma, where it would initiate an oxidative burst and induce a wide range of metabolic changes [14]. The Foyer-Halliwell-Asada pathway ensures the reduction of

ascorbate by a sequence of redox reactions involving glutathione and NAD(P)H [18]. The antioxidant power is not only limited to ascorbate and glutathione, the detoxification process being a complex network of different types of metabolites and enzymes such as polyphenols, carotenoids, tocopherols, superoxide dismutase and catalase [17], [24]. In combination with the regeneration of reducing power, *de novo* synthesis of antioxidants and repair processes of oxidized proteins participate to limit ozone effects, these processes being costly in energy [25], [26].

Amino acids are key elements in the balance between catabolism and biosynthesis of various compounds. Amino acids of the aspartate family can be used as substrate for alternative way of respiration during stress, and thus represent a source of energy [27]. Some amino acids are directly linked to antioxidants biosynthesis, such as aromatic amino acids for phenolic compounds biosynthesis [28], or cysteine which appears as a rate-limiting factor in glutathione biosynthesis [29].

The purpose of this study was to characterize the impacts of ozone on the ascorbate and glutathione content, and particularly on their biosynthetic pathways, in three Euramerican poplar genotypes differing in ozone sensitivity. Based on visible injuries and number of abscised leaves, Robusta was the most sensitive, Cima showed an intermediate sensitivity whereas Carpaccio was the least sensitive to ozone. Two complementary approaches were combined: i) the expression of genes encoding enzymes involved in the main ascorbate and glutathione biosynthesis pathways was investigated in response to ozone, and ii) the ascorbate, glutathione and amino acids contents were quantified. Our work intends to provide a new insight on the effect of ozone on ascorbate and glutathione biosynthesis and attempts to explain ozone tolerance among poplar genotypes, through a comprehensive study of interactions between gene expression and metabolites.

Materials and Methods

Ethics statement

We declare that cuttings have been bought from National Forest State nursery of Guémené-Penfao where poplar genotypes and provenances are conserved (France, Loire-Atlantique, 47°37′46″N, 1°53′33″W, 20 m a.s.l.). The master certificate has the number F52-11B004. The plant health passport has the number SPV-F PL00736.

Plant culture and exposure conditions

Three Euramerican hybrid poplar genotypes (*Populus deltoides* x *Populus nigra*), "Carpaccio", "Cima" and "Robusta" differing in ozone sensitivity based on foliar injuries, leaf fall and total biomass losses, were studied. The plant material was grown as described in [30]. Briefly, rooted cuttings were planted and kept in growth chambers (situated at Lorraine University) for 5 weeks at 23°C/21°C (day/night) with 14-h light period (250-300 µmol m^{-2} s^{-1} photon flux at leaf height). At the end of this period, 40 individuals of each genotype were divided in eight phytotronic chambers with the same environmental conditions. The plants were let to acclimate to phytotronic chambers for seven days. Four phytotronic chambers were used for each treatment during 17 days: 1) ambient treatment with charcoal-filtered air (O_3 concentration < 4 nmol mol^{-1}) and 2) ozone treatment (120 nmol mol^{-1} O_3 for 13 h, from 09:00 to 22:00). Fumigation started one hour after the beginning of the photoperiod and ran until its end.

Sampling and storage

After 2, 4, 11, 15 and 17 days from the beginning of the fumigation, the 10th and 11th leaves from the top were sampled. These leaves were mature at the start of the fumigation.

Each time different plants were used for sampling. The leaves were cut in half by removing the midrib and were immediately flash frozen in liquid nitrogen. For RNA extraction, ascorbate and glutathione quantification, half of each leaf was crushed into powder (in liquid N_2) and stored at -80°C. For metabolomic analyses, the other half was freeze-dried at -40°C for 40 h at a pressure of 10 Pa in a FreeZone Plus freeze-dryer (Labconco, Kansas City, Missouri) and then the temperature was turned back progressively to 20°C within 10 h. Freeze-dried samples were crushed with TissueLyser (Qiagen, Helsinki, Finland) 3x15 s in Safe-Lock Eppendorf tube, and stored at -80°C.

Leaf fall and biomass measurement

At the end of the experiment, the number of fallen leaves was count and all the plants were harvested, divided into stems, leaves, and roots and oven-dried (60 °C) until constant weight was reached, and then weighed.

Glutathione and ascorbate extraction and analysis

Ascorbate and glutathione were measured at 2, 4, 11 and 17 days. They were extracted from 20 mg of fresh leaf powder in 400 µL of metaphosphoric acid 5% (w/v). Homogenates were centrifuged for 10 min at 4°C with 14,000 g. Ascorbate and dehydroascorbate were measured by the method of [31], scaled down for microplates. To allow the use of a pipetting robot, the trichloroacetic acid was replaced by metaphosphoric acid 5% (w/v). Glutathione and glutathione disulfide were measured using glutathione and 2-vinylpyridine as described by [32].

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from 100mg of fresh leaf powder using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. Residual genomic DNA was removed by Dnase I (Life Technologies, Saint Aubin, France) treatment. RNA quality was assessed using the automated gel electrophoresis Experion system (Bio-Rad, Marnes la coquette, France). Quantification was performed by Quant-iT riboGreen assay (Life Technologies, Saint Aubin, France). Reverse transcription was performed on 700 ng RNA using an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Marnes la coquette, France). The Alien QRT-PCR Inhibitor Alert kit (Agilent technologies, Massy, France) was used to assess reverse transcription efficiency, following the manufacturer's protocol. Real-time PCR was performed in a Mx3000P QPCR System (Agilent technologies, Waghaeusel-Wiesental, Germany) according to the manufacturer's recommended cycling program (10 min 95°C, 40 cycles of 5 s at 95°C, and 20 s at 58 or 60°C depending on primers) followed by the generation of a dissociation curve to check for specificity of amplification. The reaction mixture contained 10µL Brillant III Ultrafast SYBR green QPCR Master mix, 0.3µL ROX (Agilent technologies, Massy, France), 250 nM of gene-specific primers and 2 µL cDNA (diluted 1/5) in each 20 µL reaction. We studied genes coding for enzymes of the main biosynthesis pathway of ascorbate and glutathione, based on homology with genes described in *Arabidopsis thaliana* (Supporting Information Table S1). The study of the glutathione pathway was extended to the links with major amino acids. Specificity of all primers has been checked by sequencing the products (Beckman Coulter Genomics, Essex, UK). No-template control (NTC) reactions were prepared for each gene. The Ct values were determined with the same threshold and PCR efficiency was estimated using a standard curve for each gene and each genotype. Efficiency values were taken into account in all subsequent calculations. The

expression values were normalized to two control genes (the internal control alien and *UBL*) and two stable genes of interest determined by the GeneNorm program (*GOGAT6* and *VTC21*).

Amino acid and polyamines extraction and analysis

Freeze-dried leaf powder (30 mg) was mixed with 1500 µL 0.005% (w/v) butylated hydroxytoluene (BHT) in 80% (v/v) MeOH and 200 µL of internal standard mixture (containing 0.3 mg/ml benzoic-d5 acid (Campro Scientific GmbH, Berlin, Germany), 0.3 mg mL^{-1} D-glucose-C13 (Campro Scientific GmbH, Berlin, Germany), 0.25 mg mL^{-1} glycerol-d8 (Campro Scientific GmbH, Berlin, Germany), 0.15 mg mL^{-1} biochanin A (Extrasynthese, Genay, France) and 0.015 mg mL^{-1} alanine-d4 (Aldrich, Steinheim, Germany) in 6:4 MeOH:H_2O). Samples were extracted for 15 min at 4°C with 1400 rpm of agitation using a thermomixer (Eppendorf, Germany). After a centrifugation for 2 min at 10°C with 13500 g, the supernatant was taken. A second extraction in 1300 µL of 0.005% (w/v) BHT in 100% MeOH was done with the same protocol and the supernatants were combined. One aliquot of 100 µL was dedicated to amino acid and polyamines analysis performed the same day using the EZ:faast kit (Phenomenex, Torrance, CA, USA) as described in the kit, except that 50 µL of the internal standard solution was used. The samples were run with EZ:faast AAA column by HPLC-MS (Thermo LTQ, Thermo Finnigan) with electrospray ionization. The areas for the amino acids and polyamines were integrated using Xcalibur software (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) and alanine-d4 was used as internal standard.

Statistical analyses

The data obtained from ascorbate and glutathione assays were fitted with a linear mixed effect model, with individuals as random variables, and treatment, genotype and time as fixed

Table 1 Ozone effect on leaf fall and total biomass

Genotypes	Leaf fall relative to ambient (% relative to number of leaf)	Total biomass relative to ambient (%)
Carpaccio	-27	-20
Cima	-34	-41
Robusta	-37	-18

Effect of ozone on leaf fall and total biomass relative to ambient condition in three poplar genotypes (Carpaccio, Cima and Robusta) after 18 days of treatment.

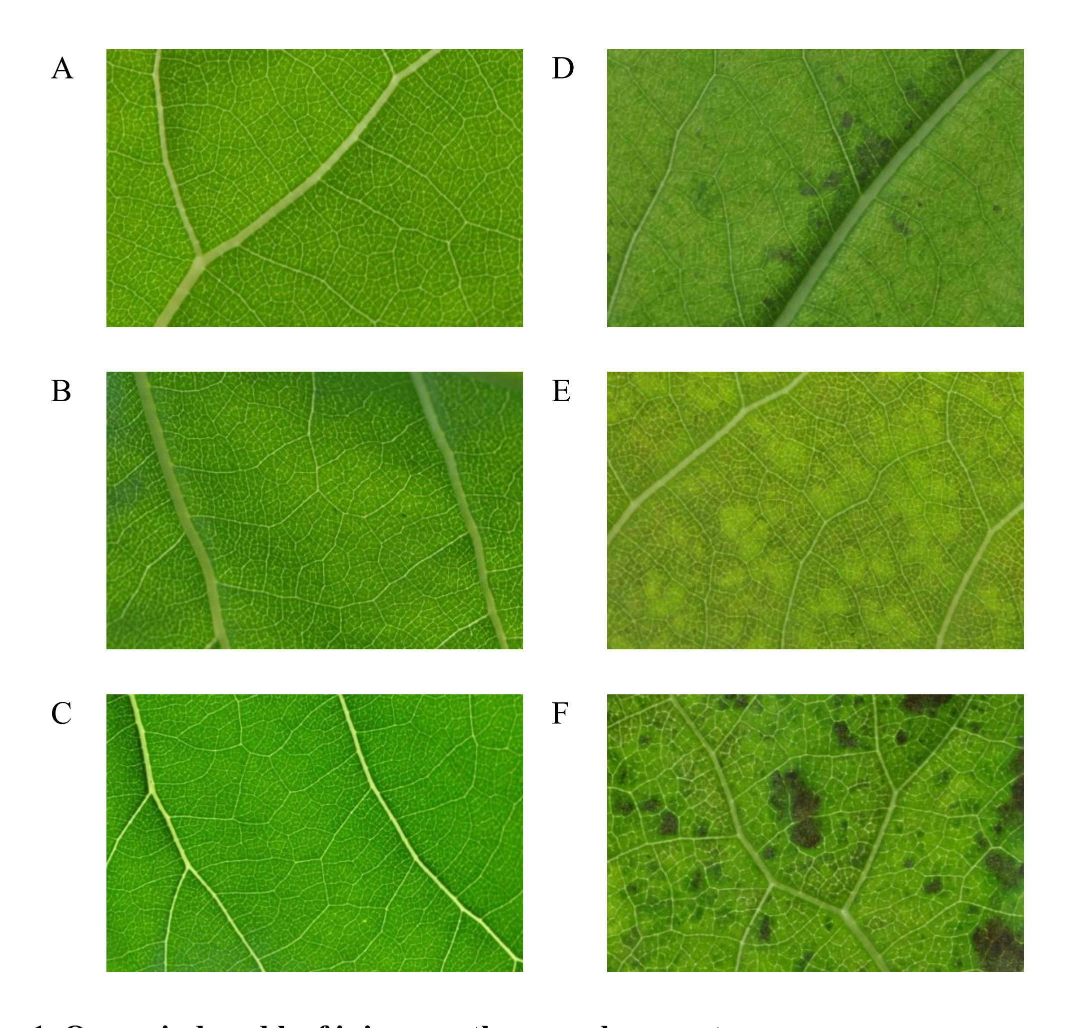


Figure 1. Ozone-induced leaf injury on three poplar genotypes.

Comparison of ozone-induced leaf injury after 17 days when submitted to charcoal-filtered air (A, B, C) or to 120 nmol mol^{-1} O_3 (D, E, F) on three poplar genotypes differing in ozone sensitivity from the most resistant to the most sensitive: Carpaccio (A, D), Cima (B, E) and Robusta (C, F).

variables. Normality and homoscedasticity of standardized residuals were graphically checked using quantile-to-quantile and residual-*vs*-predicted plots. Glutathione concentrations were log transformed to meet the assumptions of ANOVA. Factorial ANOVA was used to test for significant differences among genotypes and treatments. Student test was used to precise the genotype effect. Data were analyzed using R 2.14.2 [33] and the nlme package [34]. Effects were considered significant when $p < 0.05$. Principal component analysis (PCA) made with SIMCA-P+ 12.0.1 (Umetrics, Umeå, Sweden) was used for the amino acid data, with log transformation when necessary and UV scaling, to find out if there were any dominant patterns in the data regarding the treatment, sampling time or genotype. Heat map and clustering were performed on MeV [35], [36].

Results

Sensitivity to ozone

The sensitivity of Cima was mainly characterised by total biomass losses (Table 1) whereas Robusta was the most sensitive based on foliar injuries, with the largest necrosis (Figure 1) and the highest percentage of leaf fall (Table 1). Carpaccio appeared to be the most resistant genotype displaying only brown stippling on the leaves located at the bottom of the trees, with the lowest percentage of fallen leaves and biomass losses twice smaller than Cima.

Effects of ozone on ascorbate concentrations

In ambient condition, the concentration of total ascorbate was significantly higher in Carpaccio than in Cima and Robusta (Table 2). Ozone treatment had a strong effect on ascorbate availability. The concentration of ASA increased significantly in response to ozone in particular at the last sampling date in Carpaccio with a 2.8-fold increase and in Cima, with

Table 2 Concentration of total ascorbate and total glutathione in ambient condition in three poplar genotypes.

Genotypes	**Constitutive total ascorbate concentration (µmol g^{-1})**	**Constitutive total glutathione concentration (nmol GSH mg^{-1})**
Carpaccio	9.95 ± 0.17a	0.47 ± 0.01a
Cima	7.68 ± 0.15c	0.36 ± 0.01b
Robusta	8.62 ± 0.28b	0.35 ± 0.01b

Concentration of total ascorbate and total glutathione in ambient condition in three poplar genotypes (Carpaccio, Cima and Robusta). Mean of all the sampling dates (2, 4, 11, 15 and 17 days) (Mean ± SE). Genotype effect tested by a Student test and considered significant if $p<0.05$.

a 2-fold increase after 11 days of treatment (Figure 2A). The concentration of DHA increased significantly in Robusta in response to ozone, with the strongest response of 1.8-fold at the last sampling date, in contrast to Cima that was characterized by a decreased DHA concentration after 11 days of ozone treatment, whereas no effect was observed in Carpaccio (Figure 2B). The concentration of total ascorbate increased significantly in all three genotypes in response to ozone, with the strongest response at the last sampling date with a 1.4-fold, 1.3-fold and 1.7-fold increase in Carpaccio, Cima and Robusta respectively (Figure 2C). As a result of the lack of increase in the concentration of DHA in Carpaccio and Cima, an increase in the ascorbate redox ratio took place in response to ozone with a 1.6-fold and 1.7-fold increase, respectively, at day 11 (Figure 2D). For detailed statistical analyses see Supporting Information Table S1.

Effects of ozone on glutathione concentrations

The constitutive concentration of total glutathione was significantly higher in Carpaccio than in Cima or Robusta (Table 2). The concentration of GSH increased progressively and significantly in all three genotypes in response to ozone, with the strongest response in Carpaccio with a 2.6-fold increase compared to a 1.6-fold and 2.2-fold increase in Cima and Robusta respectively at the last sampling date (Figure 3A). The concentration of GSSG follows the same trend in all three genotypes in response to ozone, with the strongest response of 2-fold, 1.7-fold and 1.5-fold at the last sampling date in Carpaccio, Cima and Robusta respectively (Figure 3B). Thereby, the concentration of total glutathione increased progressively and significantly in all three genotypes in response to ozone, with the strongest response at the last sampling date with a 2-fold, 1.7-fold and 1.7-fold increase in Carpaccio, Cima and Robusta respectively (Figure 3C). The higher increase in GSH in Carpaccio

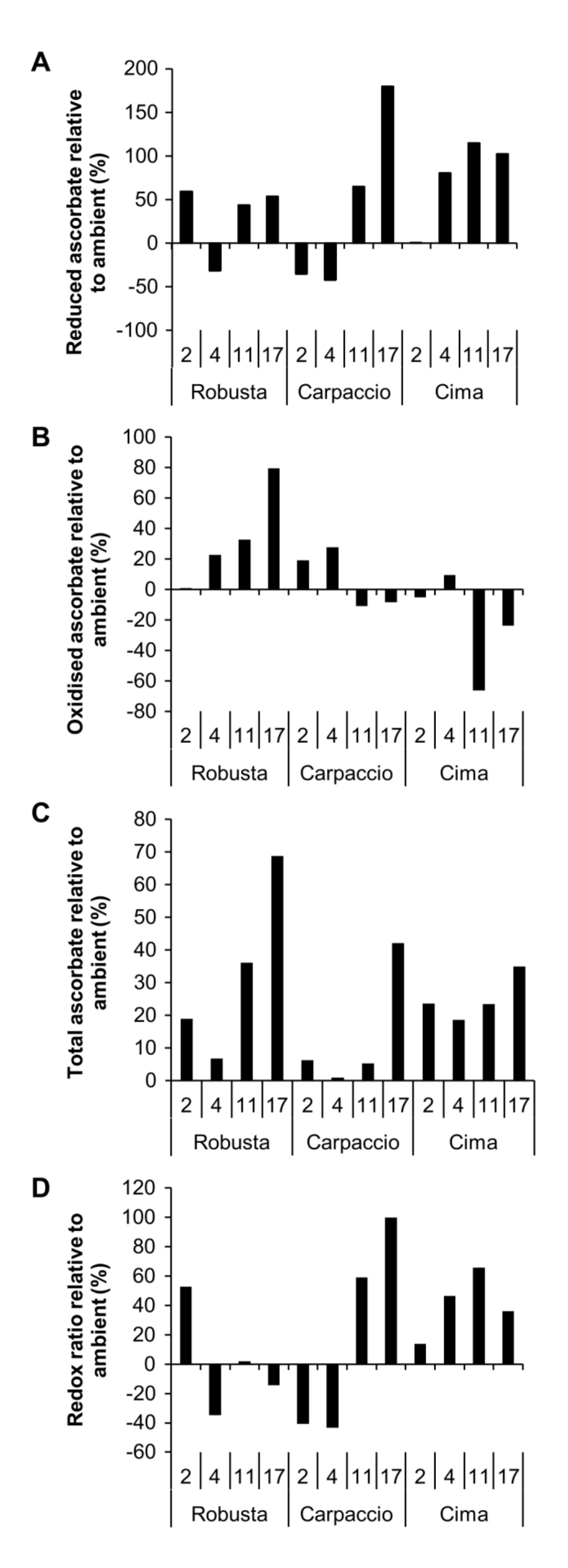


Figure 2. Ozone effects on ascorbate concentration and redox state in poplar leaf.

Effects of ozone treatment on ascorbate concentrations (percentage relative to ambient), with reduced ascorbate ASA (A), oxidised ascorbate DHA (B), total ascorbate (ASA + DHA) (C) and ascorbate redox ratio (reduced form/total) (D) on three poplar genotypes, Carpaccio, Cima and Robusta at four sampling times (2, 4, 11 and 17 days).

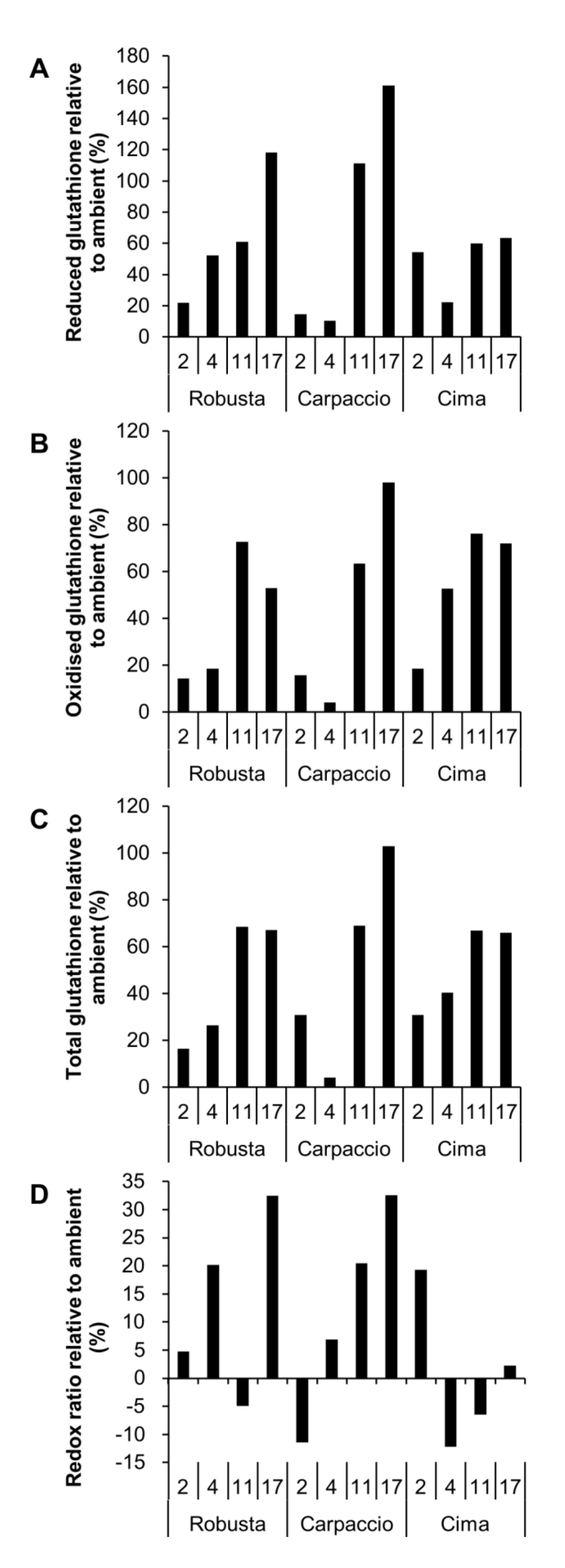


Figure 3. Ozone effects on glutathione concentration and redox state in poplar leaf.

Effects of ozone treatment on glutathione concentrations (percentage relative to ambient), with reduced glutathione GSH (A), oxidised glutathione GSSG (B), total glutathione (GSH + GSSG) (C) and glutathione redox ratio (reduced form/total) (D) on three poplar genotypes, Carpaccio, Cima and Robusta at four sampling times (2, 4, 11 and 17 days).

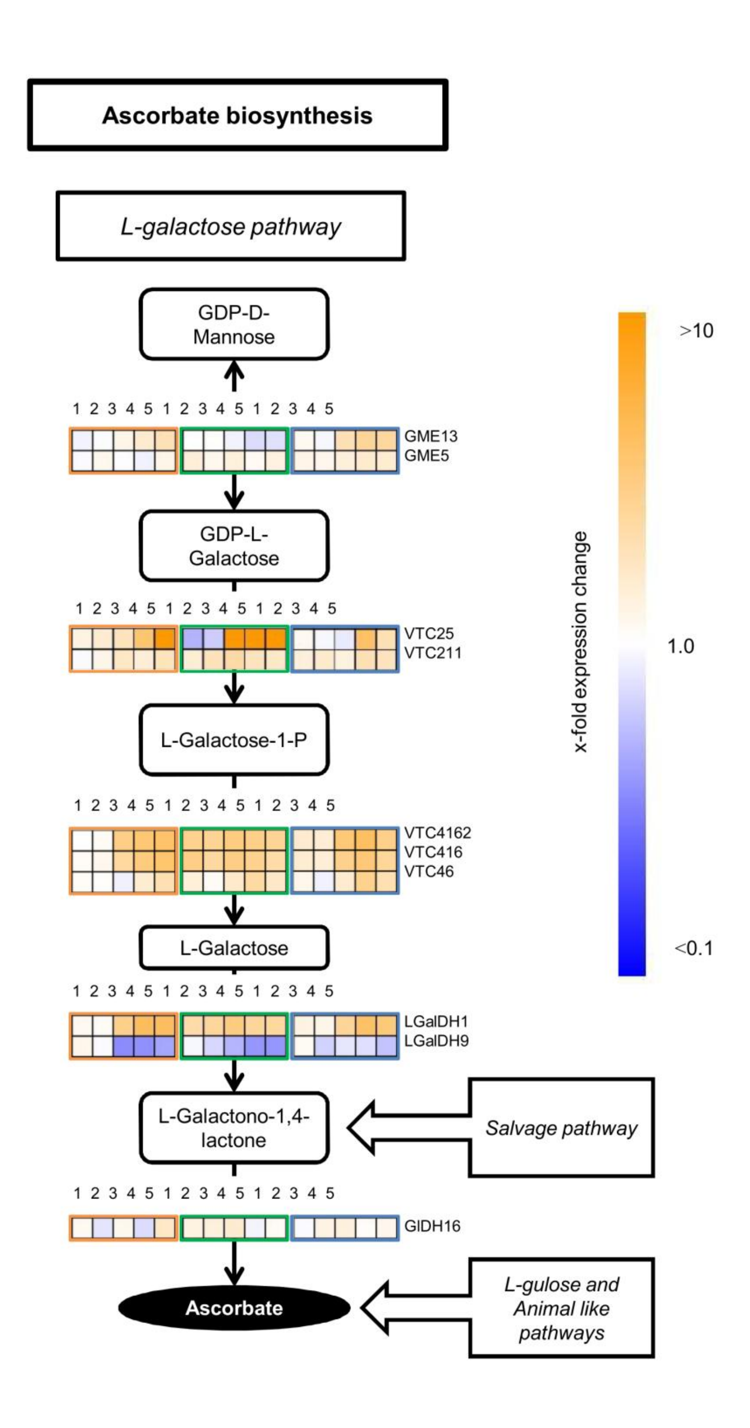


Figure 4. Ozone effects on the expression of genes encoding enzymes involved in ascorbate biosynthesis.

Heat maps representing the effects of ozone on the expression of putative genes of enzymes involved in the ascorbate biosynthesis and more precisely, the L-galactose pathway, on three poplar genotypes, Carpaccio (orange border), Cima (green border) and Robusta (blue border) at five sampling dates (1, 2, 3, 4 and 5 corresponding to 2, 4, 11, 15 and 17 days respectively).

resulted in a non significant increase in the redox state of glutathione in this genotype (Figure 3D). For detailed statistical analyses see Supporting Information Table S2.

Effects of ozone on the expression of genes involved in ascorbate biosynthesis

Ozone had a noticeable effect on the expression of genes attributed to the major ascorbate biosynthesis pathway (Figure 4; see also Supporting Information Figure S1 for complete dataset), with major effects appearing at the third sampling date (11 days) and often before in Cima. Expression of all the putative genes encoding enzymes involved in the main ascorbate biosynthesis pathway were increased in response to ozone in the three genotypes, except for the expression of *LGalDH9* which decreased, *GlDH16* and *GME5* which were almost stable in the three genotypes in response to ozone, and *GME13* which was induced in Carpaccio and Robusta whereas it decreased in Cima. The expression of *VTC25* was the most enhanced in response to ozone, with a 9.5-fold, 43.3-fold and 1.9-fold increase in Carpaccio, Cima and Robusta respectively.

Effects of ozone on the expression of genes involved in glutathione biosynthesis

Ozone treatment had a strong effect on gene expression related to glutathione biosynthesis (Figure 5; see also Supporting Information Figure S2 for complete dataset). Major effects of ozone appeared mainly from the third sampling date (11 days) and often slightly before in Cima. Expression of the putative genes encoding enzymes involved in the direct glutathione biosynthesis pathway from Cys, Glu and Gly were increased in response to ozone in the three genotypes. Expression of most of the putative genes encoding enzymes involved in the synthesis of these three amino acids from other amino acids were also increased in response to ozone in the three genotypes except for the expression of *GOGAT12*, *GOGAT16*, *GS10*, *GS8*, *GlyA8*, *GT10*, *GT8* and *THA19* that decreased in response to ozone in the three genotypes.

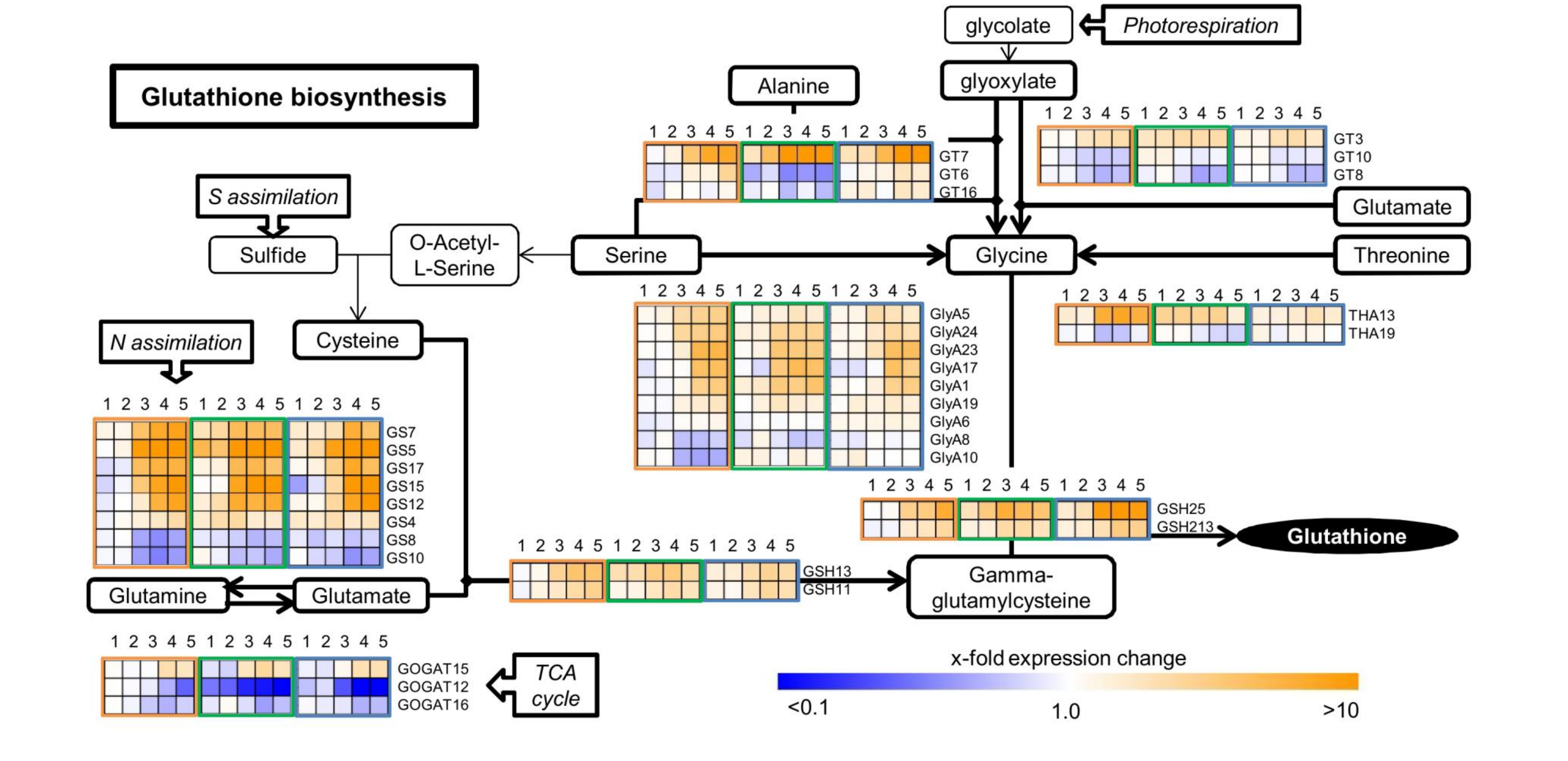


Figure 5. Ozone effects on the expression of genes encoding enzymes involved in glutathione biosynthesis.

Heat maps representing the effects of ozone on the expression of putative genes of enzymes involved in the glutathione biosynthesis on three poplar genotypes, Carpaccio (orange border), Cima (green border) and Robusta (blue border) at five sampling dates (1, 2, 3, 4 and 5 corresponding to 2, 4, 11, 15 and 17 days respectively).

There were only few genes that showed very contrasting response to ozone between genotypes. Thus, the expression of *GlyA10* decreased strongly in Carpaccio while it was quite stable in response to ozone in the other two genotypes. The expression of *GT6* and *GT16* decreased in Cima, but increased, in Carpaccio and Robusta. The expression of *GSH13* was more than 1.8-fold lower in ambient condition in Robusta than in Cima and Carpaccio and was also less increased in Robusta (2.1-fold) than in Carpaccio (3.5-fold) and Cima (2.3-fold) (Figure 6A). The expression of *GSH25* and *THA13* were 3.6-fold and more than 1.5-fold higher in ambient condition in Carpaccio than in the other two genotypes (Figure 6B, C). In response to ozone, the expression of *GSH25* was still 2.4-fold higher in Carpaccio than in the other two genotypes (Figure 6B). The expression of *THA13* increased very strongly in Carpaccio in response to ozone (5.3-fold) while the increase was much lower in Cima (1.4-fold) and Robusta (1.5-fold) (Figure 6C).

Effects of ozone on amino acid contents

Ozone treatment had a contrasted effect on amino acid contents. The major effects of ozone appeared mainly from the third sampling date. As illustrated by the PCA, the variance in concentrations of the amino acids was explained at 40%, 17% and 11% by three components, PC1, PC2 and PC3, respectively (Figure 7). PC1 and PC2 show the ozone effect by separating ambient and ozone samples, and stronger separation in later time points especially in Carpaccio (Figure 7A). PC2 and PC3 show the genotype effect, in addition to the ozone effects, by separating Carpaccio and Robusta samples whereas Cima is not separated from the two genotypes (Figure 7C). The variations in concentrations of Val, Asn, Thr, Ser, and Leu explain the time effect (Figure 7B). The ozone effect was mainly accounted for by variations in Trp, Ile, His, Tyr and Asp concentrations and the genotype effect, especially the difference between Carpaccio and Robusta, by a difference in Put, Lys and Phe concentrations

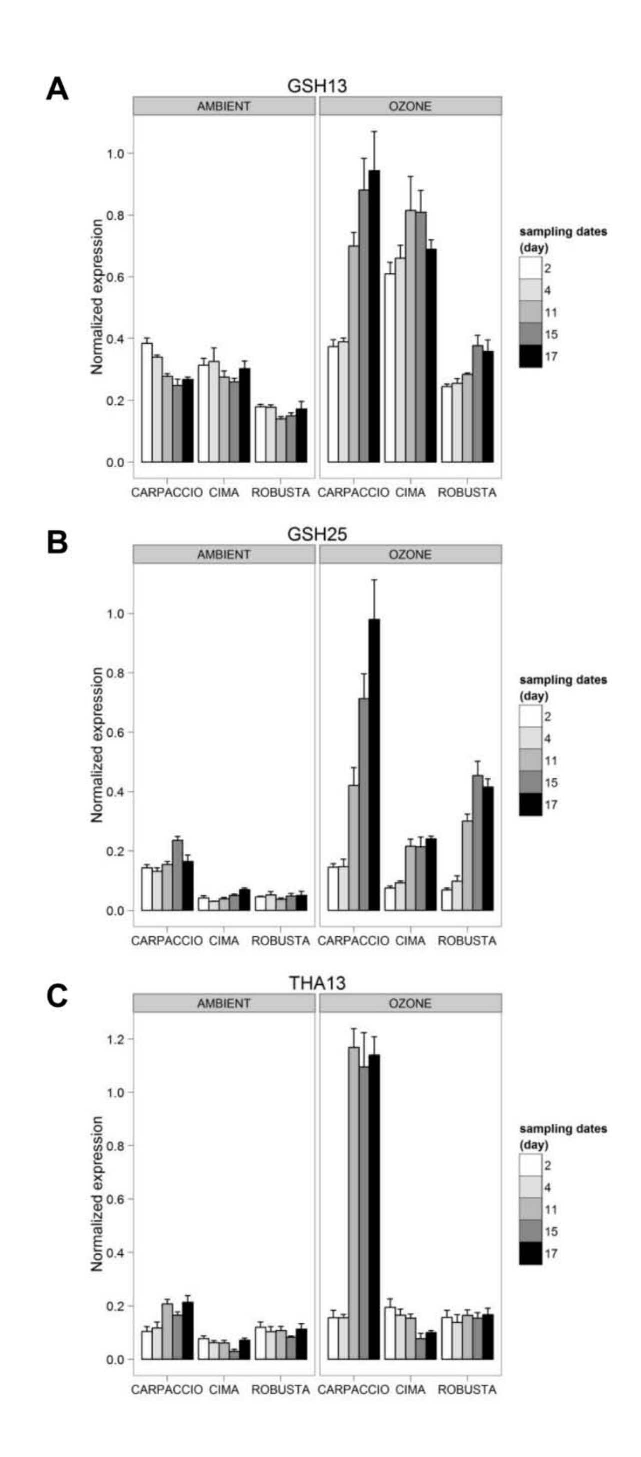


Figure 6. Ozone effects on gene expression of gamma-glutamylcysteine synthase, glutathione synthase and threonine aldolase.

Effects of ozone on the expression of putative genes (mean ± SE) of gamma-glutamylcysteine synthase (A), glutathione synthase (B) and threonine aldolase (C) on three poplar genotypes, Carpaccio (orange border), Cima (green border) and Robusta (blue border) at five sampling dates (2, 4, 11, 15 and 17 days).

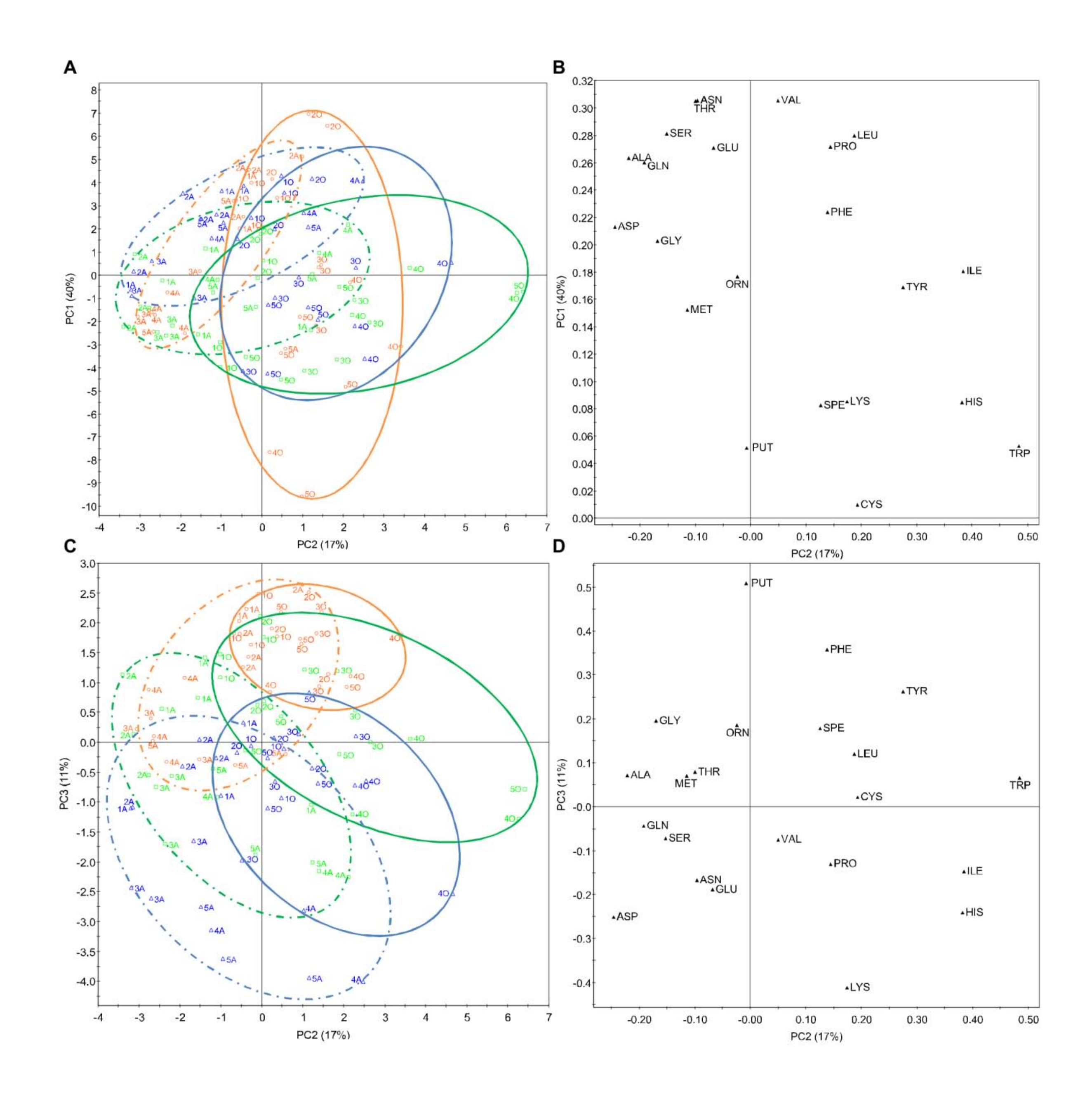


Figure 7. Representation of genotype and ozone effects on amino acid concentrations in poplar leaf.

Principal Component Analysis score plot of PC1 and PC2 (A), PC3 and PC2 (C) and the corresponding PCA loading plots (B and D) of the Amino acids and polyamines concentrations in leaves of three poplar genotypes, Carpaccio (orange circles), Cima (green squares) and Robusta (blue triangles) submitted to ambient (A, dotted line) or Ozone treatment (O, solid line) at five sampling dates (1, 2, 3, 4 and 5 corresponding to 2, 4, 11, 15 and 17 days respectively).

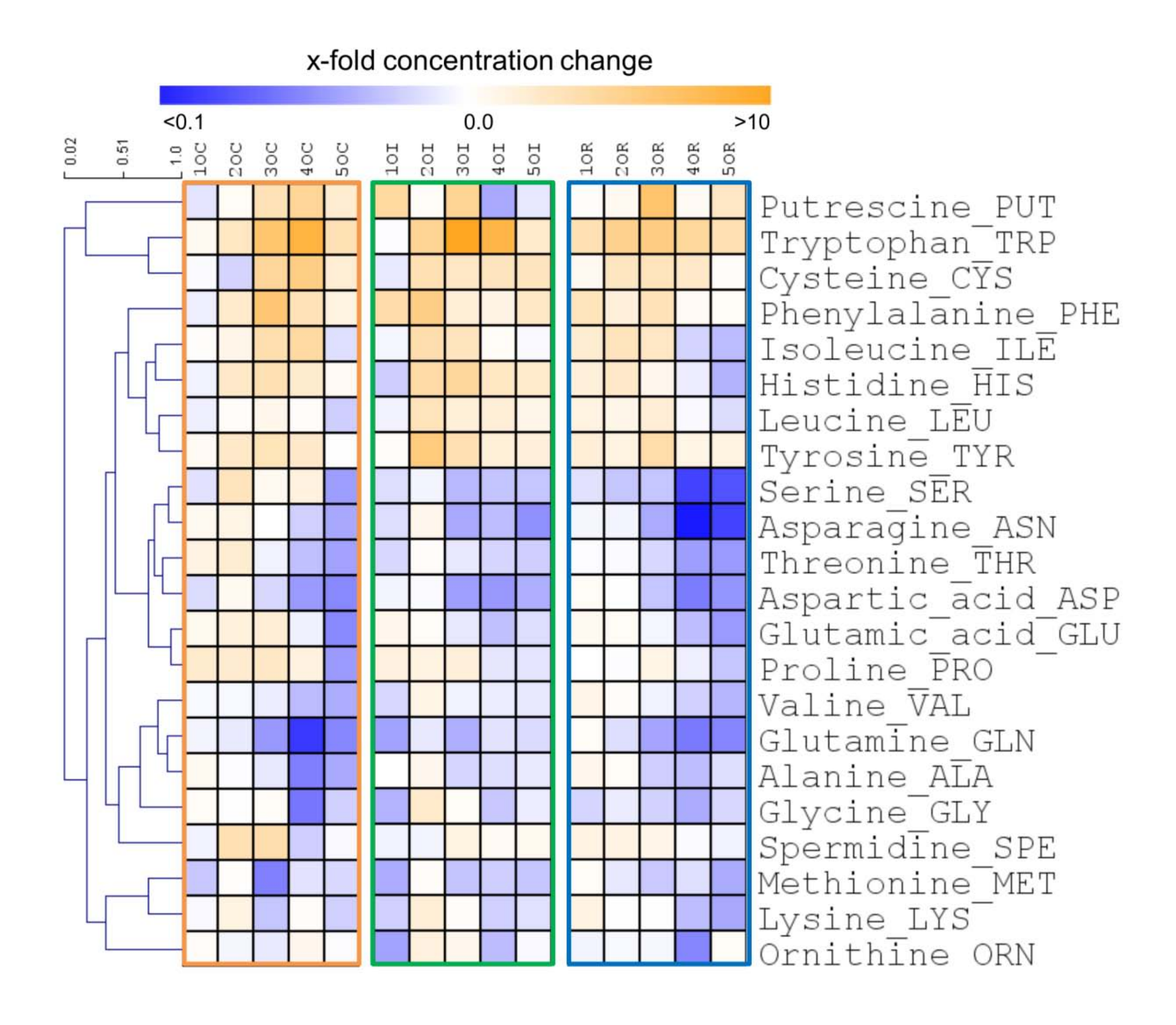


Figure 8. Ozone effects on amino acid concentrations in poplar leaf

Heat map representing the effects of ozone on the Amino acids and polyamines concentrations in leaves of three poplar genotypes, Carpaccio (orange border), Cima (green border) and Robusta (blue border) at five sampling dates (1, 2, 3, 4 and 5 corresponding to 2, 4, 11, 15 and 17 days respectively). Compounds are clustered by Pearson correlation.

(Figure 7D). Most of the amino acids and polyamines concentrations decreased with time in response to ozone, except for Put, Trp, Cys, Phe, Ile, His, Leu and Tyr (Figure 8, see also Supporting Information Figure S3 for complete dataset). Asp, which is one of the most abundant amino acids decreased strongly, thus there was a strong decrease in total amino acids content (Figure 9, Supporting Information Figure S3).

Discussion

Reduced ascorbate and glutathione availability may be linked to ozone tolerance in poplar.

Each compartment controls the redox signaling independently by its own antioxidative capacities [39]. Ozone generates ROS in apoplastic space before to spread in other cellular compartments. Ascorbate is present in various cell compartments, including apoplast, where it is limited in O_3 scavenging, because of low levels of its reduced form [37], [38]. Transport of ascorbate in the cell is necessary for its regeneration, thus, we focus on the overall response of ascorbate. Carpaccio, the least sensitive genotype to ozone [23], [30], had the highest total leaf ascorbate concentration, but not higher constitutive ASA level than Cima and Robusta showing that constitutive ASA level is insufficient for explaining ozone resistance in poplar [40], [21]. In response to ozone, Carpaccio and Cima showed a strong increase in total ascorbate due to a strong increase in ASA. In contrast, in Robusta, the most sensitive to ozone, the total ascorbate concentration increased due to an increase of DHA concentration, while ASA concentration remained stable. Thus, Robusta produced *de novo* ascorbate in response to ozone, but was unable to regenerate it efficiently. Ascorbate is regenerated by monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) at the expense of NAD(P)H or GSH [18]. Ozone leads to an increase of respiration which can

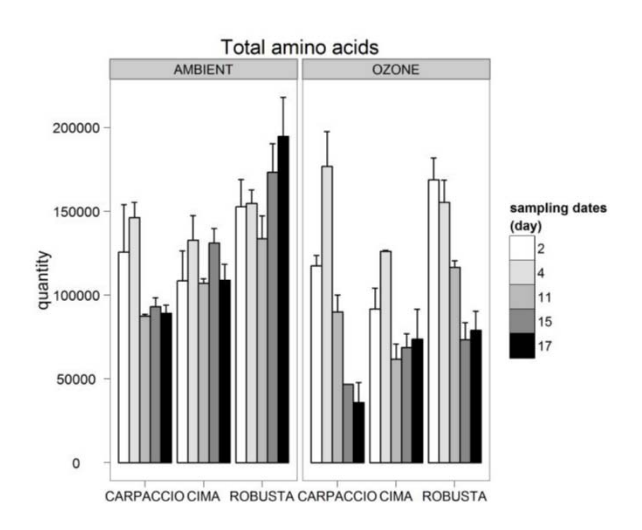


Figure 9. Ozone effect on the total amino acid concentration.

Total amino acids content in leaves of three poplar genotypes (Carpaccio, Cima and Robusta) exposed to ambient or ozone treatment at 2, 4, 11, 15 and 17 days. (Mean ± SE) (µmol g^{-1} DW with alanine-d4 as the internal standard)

participate in the supply of reducing power when the photosynthesis is decreased [30]. As shown by [30], in ozone treated leaves, Carpaccio sustains high levels of NAD(P)H while in Robusta, NAD(P)H levels decreased. The inability of Robusta to regenerate its ASA pool in response to ozone was not due to a decrease of GSH. It may be linked to the decrease of NAD(P)H, an alteration of NAD(P)H turnover [30], or an insufficient activity of MDHAR and DHAR. The tolerance of Carpaccio to ozone might be related to its capacity to regenerate ASA, but must be combined with other factors of tolerance. GSH is the reducing co-factor for several enzymes involved in ROS detoxification, thus playing a central role as an antioxidant but also as a component of cell signalling [41], [42]. The glutathione redox ratio remained stable under ozone, preserving cell signalling which suggests that the activity of glutathione reductase (GR) was sufficient to maintain the glutathione pool in O_3-treated leaves [21]

Carpaccio had higher glutathione concentrations, in its two forms and their increases under ozone are stronger than in other genotypes. The higher *de novo* synthesis of glutathione, and therefore, the higher availability of glutathione in Carpaccio, could be an important tolerance trait, as found in another tolerant poplar genotype [21].

Ascorbate *de novo* synthesis in response to ozone correlated with VTC2 gene expression regulation in poplar.

There are several routes of ascorbate biosynthesis in plants although it occurs mainly *via* the L-galactose pathway [43]. GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) catalyzes the first step of two ascorbate biosynthesis pathways, the L-galactose and the L-gulose pathways [44]. GME plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis [45]. Even if its regulation at the gene expression level was weak, it could be completed by an induced activity of GME caused by an increase in $NAD(P)^+$ due to oxidative stress [46].

GDP-L-galactose phosphorylase (VTC2) produces the first metabolite dedicated to ascorbate biosynthesis pathway and has been shown to represent the major controlling step at the transcriptional level of ascorbate synthesis [43]. This is consistent with our results, as the expression of *VTC25,* the most responsive gene involved in the L-galactose pathway, correlated with ascorbate accumulation in response to ozone. Although we observed an increased expression of *VTC416*, *VTC4162*, *VTC46* and *LGalDH1*, it has been suggested that a gene expression increase of L-Galactose-1-P phosphatase (VTC4), which is involved in both L-galactose and animal-like pathways [47], is not always correlated with change of VTC4 activity and that L-Galactose dehydrogenase (LGalDH) exerts little control on ascorbate biosynthesis [43], [48]. L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) catalyzes the last step of ascorbate biosynthesis by the L-galactose pathway and the salvage pathway. Although the transcript level of GLDH generally follows the same trend as ascorbate content, the effect of increase in GLDH gene expression can vary between species and even between organs, and is not always correlated with ascorbate content [49], [50], [51]. In our experiment, *GLDH16* expression was barely increased in response to ozone and thus, cannot explain the increase in ascorbate.

In conclusion, our results suggest that in poplar, under ozone stress, increased ascorbate levels are associated to a transcriptional induction of ascorbate biosynthesis mainly by genes encoding VTC2.

Glutathione *de novo* synthesis in response to ozone may be linked to increase in GSH1 and GSH2 genes expression combined with remobilization processes in poplar.

The glutathione biosynthesis pathway consists of a two-step reaction sequence from Cys, Glu and Gly: 1) gamma-glutamylcysteine synthetase (γ-ECS) catalyses the formation of gamma-glutamylcysteine and 2) final step catalyzed by glutathione synthetase (GSH-S) from Gly and gamma-glutamylcysteine [42]. The activity of γ-ECS is one of the controlling factors of glutathione synthesis, whereas the activity of GSH-S has less impact [52]. Here, Cys content and γ-ECS activity increased under ozone, suggesting that GSH-S activity could become limiting in turn, justifying the increased gene expression of GSH-S observed. Higher expression of these genes in Carpaccio could, in part, explains the increase in its tolerance to ozone. The glutamine synthetase (GS) family has been previously described by [53]. The expression of the two genes coding for the chloroplastic GS isoenzyme in poplar, *GS8* and *GS10*, decreased in response to ozone, whereas the expression of genes coding for the cytosolic isoenzyme increased. Ozone led to the same responses as senescence and pathogen attack, i.e. a decreased expression of chloroplastic gene proteins (*GS8*, *GS10*, *GOGAT12 and GOGAT16*) whereas the expression of genes of the cytosolic isoforms is induced to allow a remobilization of N and to sustain glutamate availability [54]. The major Gly biosynthesis pathway is linked to photorespiration [55]. The fact that photorespiration is inhibited by ozone treatment [56] may explain the large decrease observed in our experiment, in the expression of genes coding for enzymes involved in photorespiration such as glyoxylate aminotransferase. Gly and Ser are two amino acids that are readily interconvertible. As described by [57], there is a serine-to-glycine conversion by cytosolic Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) connected with C1 metabolism and a glycine-to-serine

conversion by mitochondrial SHMT. The expression of genes of mitochondrial SHMT (*GlyA3* and *GlyA10*) decreased in response to ozone, whereas the expression of genes of cytosolic SHMT isoform was induced by ozone. Ozone stimulates C1 metabolism via enhanced lignification in leaves [58], and thus could increase the production of Gly by cytosolic SHMT, which could be used for glutathione production. Gly can also be synthesised from Thr, but this reaction has been poorly studied. It has been suggested that Thr aldolase could contribute to maintaining Gly homeostasis in plants at times of transition in the use of the photorespiratory cycle [59]. In response to ozone, Thr aldolase could maintain Gly content and thus, the observed increase of *THA13* expression in Carpaccio could be helpful to tolerate ozone.

The stronger upregulation of GSH1, GSH2 and THA13 genes expression correlated with the increased concentration of reduced glutathione in the ozone tolerant genotype, Carpaccio. Our results suggest that in poplar, the enhanced glutathione biosynthesis is mainly due to an increased GSH1 and GSH2 genes expression combined with remobilization processes.

Regulation of plant amino acid metabolism in response to ozone.

De novo synthesis of antioxidants and repair processes induced by ozone lead to increased needs for amino acids, requiring remobilization processes. The central position of amino acids in between anabolic and catabolic pathways complicates the interpretation of their concentrations. Monitoring pools of amino acids at five measurement points allows to highlight the strongest trends characterizing the remobilization of amino acids under ozone treatment. While concentrations of most of the amino acids decreased in response to ozone, Cys, Ile and the aromatic amino acids (Phe, Tyr, Trp) as well as the polyamine Put, increased. Cys content is one of the limiting factors of glutathione biosynthesis [52] and was increased in

response to ozone, mainly in Carpaccio, probably due to a redox regulation of APS reductase activity [60]. The increase in aromatic amino acids may be due to an induction of shikimate pathway under ozone [58], [61], [62]. Aromatic amino acids are precursors of various important metabolites [28] like lignins, phenolic acids and flavonoids that have been shown to strongly increase in response to ozone in many studies [58], [63], [64], [65]. Under ozone, an increase of putrescine content occurred mainly in Carpaccio and elevated levels of putrescine are correlated with ozone resistance in various species [66], [67], [68]. Aspartate-family amino acids (Ile, Asn, Lys, Met, Thr, and Asp) have been suggested to represent an alternative catabolic pathway as substrate for TCA cycle under various abiotic stresses that cause energy deprivation, such as ozone [27]. This could explain the final decrease of the aspartate-family amino acid-levels in response to ozone.

Our results suggest an important remobilization of amino acids in response to ozone, in order to provide energy and antioxidants to limit the negative effects. Ozone appeared to lead to energy deprivation and to induce regulation at the transcriptomic level linked with metabolomic changes. The response to ozone is highly complex as it consists of many interactions at different scales and involves several metabolic and catabolic pathways. Studies aiming to understand the resistance to ozone should incorporate several techniques to obtain a more comprehensive view. Here we report that the higher resistance of Carpaccio could reside in its capability to increase and regenerate its antioxidants, like ASA and GSH, and to find energy resources by remobilizing its amino acids pool (Figure 10). Although Cima shared some of these factors and responded even more rapidly than Carpaccio, it is not enough to make it as tolerant as Carpaccio, but allowed it to better withstand than Robusta. Indeed, it seems that a unique indicator of resistance is very unlikely; but it is rather the sum of several factors that increases the resistance.

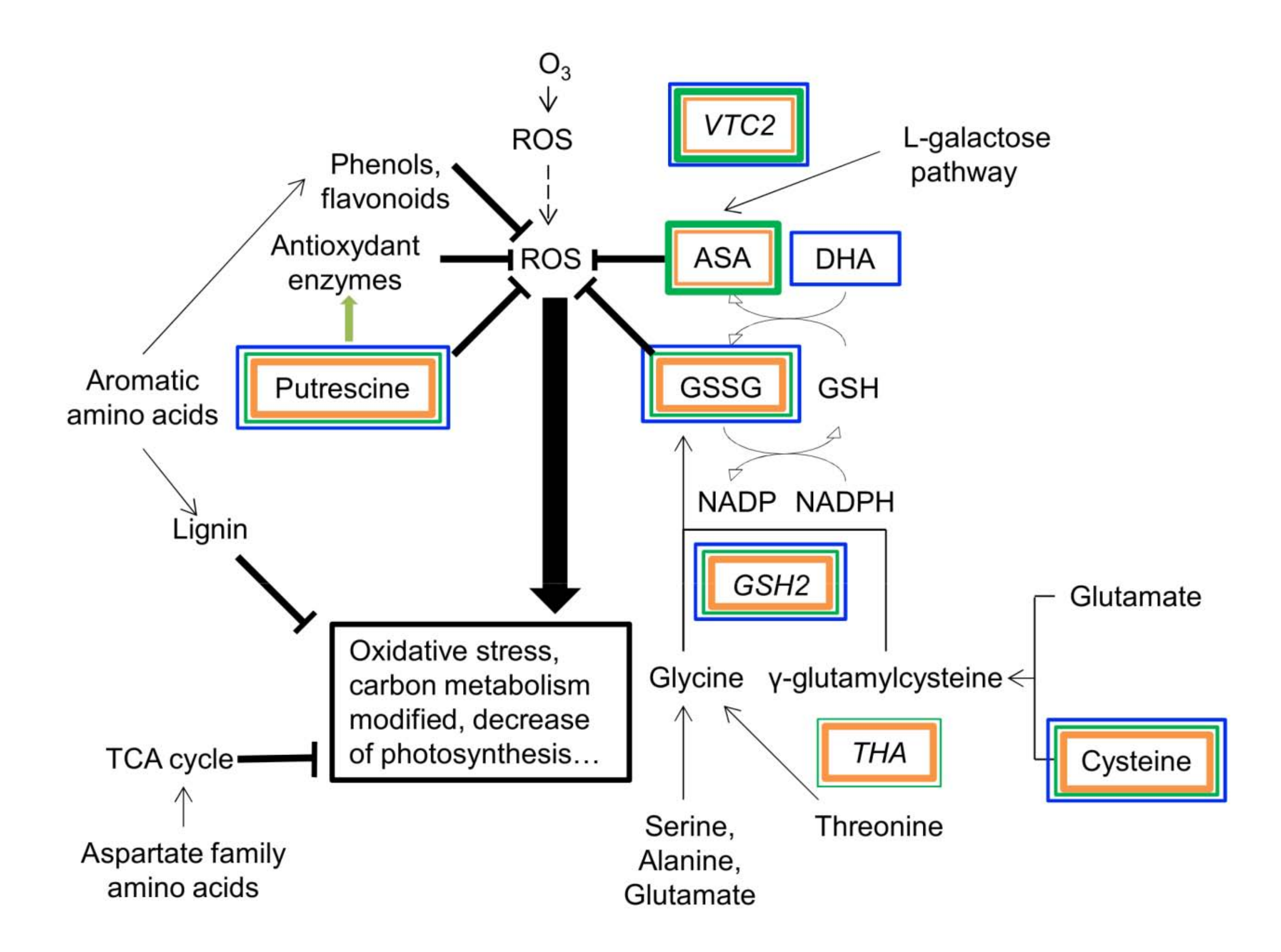


Figure 10. Scheme of the factors partly explaining ozone sensitivity among poplar genotypes.

Synthesis of parameters that may be involved in the difference in ozone sensitivity between the three genotypes. Colour frames (Carpaccio in orange, Cima in green and Robusta in blue) represent an increase of concentration or gene expression (italics), the thickness showing the intensity of the increase. Only parameters that varied differently among genotypes are colour framed. No decrease has been shown in our study to be involved in the differences of sensitivity between the genotypes.

Acknowledgements

The authors are thankful to Stéphane Martin, Fabien Spicher and Patricia Ballias for technical assistance. We thank Olivier Forestier and his team from the State Forest nursery of Guémené Penfao for providing the cuttings. This work was supported by the COST action FP0903 (STSM), the IFR110 EFABA, the French National Research Agency, ANR, project VMCS “Vulnoz", the Lorraine Region and the Academy of Finland (project nro 138161)

References

1. Sandermann H (1996) Ozone and plant health. Annu Rev Phytopathol 34: 347-366.

2. Vingarzan R (2004) A review of surface ozone background levels and trends. Atmos Environ 38: 3431-3442.

3. Sitch S, Cox PM, Collins WJ, Huntingford G (2007) Indirect radiating forcing of climate change through ozone effects on the land-carbon sink. Nature 448: 791-795.

4. ASPA (2010) Bilan de qualité de l'air en Alsace: Période 2000 à 2009. ASPA 10083002 – ID.

5. MEDDTL (2010) Bilan de la qualité de l'air en France en 2010.

6. Felzer BS, Cronin T, Reilly JM, Melillo JM, Wang X (2007) Impacts of ozone on trees and crops. CR Geosci 39: 11-12.

7. Van Dingenen R, Dentener FJ, Raes F, Krol MC, Emberson L, et al. (2009) The global impact of ozone on agricultural crop yields under current and future air quality legislation. Atmos Environ 43: 604-618.

8. Avnery S, Mauzerall DL, Liu J, Horowitz LW (2011) Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 1 Year 2000 crop production losses and economic damage. Atmos Environ 45: 2284-2296.

9. Dizengremel P (2001) Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. Plant Physiol Biochem 39: 729-742.

10. Wittig VE, Ainsworth EA, Naidu SL, Karnosky DF, Long SP (2009) Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. Glob Chang Biol 15: 396-424.

11. Matyssek R, Le Thiec D, Löw M, Dizengremel P, Nunn AJ, et al. (2006) Interactions between drought and O_3 stress in forest trees. Plant Biol. 8: 11-17.

12. Heath RL (2008) Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change? Environ Pollut 155: 453-463.

13. Ainsworth EA, Yendrek CR, Sitch S, Collins WJ, Emberson LD (2012) The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. Annu Rev Plant Biol 63: 15.1-15.25.

14. Castagna A, Ranieri A (2009) Detoxification and repair process of ozone injury: From O_3 uptake to gene expression adjustment. Environ Pollut 157: 1461-1469.

15. Ishida H, Makino A, Mae T (1999) Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. J Biol Chem 274: 5222-5226.

16. Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55: 373-399.

17. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network in plant. Trends Plant Sci 9: 490-498.

18. Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and Glutathione: the heart of the redox hub. Plant Physiol 155: 2-18.

19. Dizengremel P, Le Thiec D, Bagard M, Jolivet Y (2008) Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. Environ Pollut 156: 11-15.

20. Matyssek R, Wieser G, Calfapietra C, De Vries W, Dizengremel P, et al. (2012). Forests under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future directions for research. Environ Pollut 160 : 57-65.

21. Di Baccio D, Castagna A, Paoletti E, Sebastiani L, Ranieri A (2008) Could the differences in O_3 sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O3 influx? Tree Physiol 28: 1761-1772.

22. Brosché M, Merilo E, Mayer F, Pechter P, Puzõrjova I, et al. (2010) Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance. Plant Cell Environ 33: 914-925.

23. Dumont J, Spicher F, Montpied P, Dizengremel P, Jolivet Y, et al. (2013) Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO_2 and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* x *nigra* genotypes. Environ Pollut 173: 85-96.

24. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 2: 152-159.

25. Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. Annu Rev Plant Biol 58: 459-481.

26. Wieser G, Matyssek R (2007) Linking ozone uptake and defense towards a mechanistic risk assessment for forest trees. New Phytol 174: 7-9.

27. Kirma M, Araujo WL, Fernie AR, Galili G (2012) The multifaceted role of aspartate-family amino acids in plant metabolism. J Exp Bot 63: 4995-5001.

28. Maeda H, Dudareva N (2012) The Shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. Annu Rev Plant Biol 63: 73-105.

29. Noctor G, Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Foyer CH, et al. (1996) Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing [gamma]-glutamylcysteine synthetase. Plant Physiol 112: 1071-1078.

30. Dghim AA, Dumont J, Hasenfratz-Sauder MP, Dizengremel P, Le Thiec D, et al. (2013) Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone sensitivity. Physiol Plant 148: 38-50.

31. Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. Anal Biochem 225: 165-167.

32. Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal Biochem 106: 207-212.

33. R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

34. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Deepayan S, R Development Core Team (2012) Nlme: Linear and Nonlinear Mixed effects Models. R package version 3.1-103.

35. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques 34: 374-378.

36. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, et al. (2006). TM4 microarray software suite. Methods Enzymol 411: 134-93.

37. D'Haese D, Vandermeiren K, Asard H, Horemans N (2005). Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L. Plant Cell Environ 28: 623-632.

38. Booker FL, Burkey KO, Jones AM (2012) Re-evaluating the role of ascorbic acid and phenolic glycosides in ozone scavenging in the leaf apoplast of *Arabidopsis thaliana* L. Plant Cell Environ 35: 1456-1466.

39. Munné-Bosch S, Queval G, Foyer CH (2013) The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance. Plant Physiol 161: 5-19.

40. Ranieri A, Castagna A, Padu E, Moldau H, Rahi M, et al. (1999) The decay of O_3 through direct reaction with cell wall ascorbate is not sufficient to explain the different degrees of O_3-sensitivity in two poplar clones. J Plant Physiol 154: 250-255.

41. Galant A, Preuss ML, Cameron JC, Jez JM (2011) Plant glutathione biosynthesis: diversity in biochemical regulation and reaction products. Front Plant Sci 2: 1-7.

42. Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, et al. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. Plant Cell Environ 35: 454-484.

43. Linster CL, Clarke SG (2008) L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. Trends Plant Sci 13: 567-573.

44. Wolucka BA, Van Montagu M (2007) The VTC2 cycle and the de novo biosynthesis pathways for vitamin C in plants: An opinion. Phytochemistry 68: 2602-2613.

45. Gilbert L, Alhagdow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, et al. (2009) GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. Plant J 60: 499-508.

46. Wolucka BA, Van Montagu M (2003) GDP-mannose 3,5-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. J Biol Chem 278: 47483-47490.

47. Torabinejad J, Donahue JL, Gunesekera BN, Allen-Daniels MJ, Gillaspy GE (2009) VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. Plant Physiol 150: 951-961.

48. Gatzek S, Wheeler GL, Smirnoff N (2002) Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in Arabidopsis thaliana provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. Plant J 30: 541-553.

49. Ishikawa T, Dowdle J, Smirnoff N (2006) Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. Physiol Plant 126: 343-355.

50. Alhagdow M, Mounet F, Gilbert L, Nunes-Nesi A, Garcia V, et al. (2007) Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. Plant Physiol 145: 1408-1422.

51. Tsuyoshi I, Mamiko N, Yusuke B, Masashi H, Kazuko O, et al. (2009) Importance of the l-galactonolactone pool for enhancing the ascorbate content revealed by l-galactonolactone dehydrogenase-overexpressing tobacco plants. Plant Cell Tissue Organ Cult 96: 105-112.

52. Noctor G (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. Plant Cell Environ 29: 409-425.

53. Castro-Rodriguez V, Garcia-Gutiérrez A, Canales J, Avila C, Kirby EG, et al. (2011) The glutamine synthetase gene family in ***Populus***. BMC Plant Biol **11: 1-16.**

54. Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, et al. (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Ann Bot 105: 1141-1157.

55. Igarashi D, Tsuchida H, Miyao M, Ohsumi C (2006) Glutamate:glyoxylate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. Plant Physiol 142: 901-910.

56. Bagard M, Le Thiec D, Delacote E, Hasenfrat-Sauder MP, Banvoy J, et al. (2008) Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. Physiol Plant 134: 559-574.

57. Mouillon JM, Aubert S, Bourguignon J, Gout E, Douce R, et al. (1999) Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. Plant J 20: 197-205.

58. Cabané M, Pireaux JC, Leger E, Weber E, Dizengremel P, et al. (2004) Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. Plant Physiol 134: 586-594.

59. Joshi V, Laubengayer KM, Schauer N, Fernie AR, Jander G (2006) Two ***Arabidopsis*** threonine aldolases are nonredundant and compete with threonine deaminase for a common substrate pool. Plant Cell 18: 3564-3575.

60. Bick JA, Setterdahl AT, Knaff DB, Chen Y, Pitcher LH, et al. (2001) Regulation of the plant-type 5′-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress. Biochemistry 40: 9040-9048.

61. Janzik I, Preiskowski S, Kneifel H (2005) Ozone has dramatic effects on the regulation of the prechorismate pathway in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3). Planta 223: 20-27.

62. Betz GA, Gerstner E, Stich S, Winkler B, Welzl G, et al. (2009) Ozone affects shikimate pathway genes and secondary metabolites in saplings of European beech (*Fagus sylvatica* L.) grown under greenhouse conditions. Trees 23: 539-553.

63. Yamaji K, Julkunen-Tiitto R, Rousi M, Freiwald V, Oksanen E (2003) Ozone exposure over two growing seasons alters root-to-shoot ratio and chemical composition of birch (*Betula pendula* Roth). Glob Chang Biol 9: 1363-1377.

64. Peltonen PA, Vapaavuori E, Julkunen-Tiitto R (2005) Accumulation of phenolic compounds in birch leaves is changed by elevated carbon dioxide and ozone. Glob Chang Biol 11: 1305-1324.

65. Kontunen-Soppela S, Ossipov V, Ossipova S, Oksanen E (2007) Shift in birch leaf metabolome and carbon allocation during long-term open-field ozone exposure. Glob Chang Biol 13: 1053-1067.

66. Langebartels C, Kerner K, Leonardi S, Schraudner M, Trost M, et al. (1991) Biochemical plant responses to ozone. 1. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. Plant Physiol 95: 882-889.

67. Ye B, Müller HH, Zhang J, Gressel J (1997) Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and wheat. Plant Physiol 115: 1443-1451.

68. Durmus N, Kadioglu A (2005) Spermine and putrescine enhance oxidative stress tolerance in maize leaves. Acta Physiol Plant 27: 515-522.

Table S1

List of genes studied with their specific primers.

Gene Name	Phytozome v2.2 name	Primers F and R 5'- 3'	Alias	NCBI reference	Phytozome description
GlDH16	POPTR_0016s03990	ATGGTCTCCTGCTTCCTTAA CAGTATGGGGTTGTATGGTA	Potri.016G040300 Pt-ATGLDH.1 gw1.XVI.1375.1	Ref|XM_002322605.1|	similar to L-galactono-1; similar to 4-lactone dehydorogenase; [ortholog of At3g47930]
GlyA1	POPTR_0001s32770	CCGTTCTTGGTCTTGTAGTT TGACATTCATCCCAGCATGA	Potri.001G320400	gb|EF150637.1|	
GlyA5	POPTR_0005s16360	ACACAGGGCTTTTGTTGCCT CCAGTTTGCGGGTTCACTTT	Potri.005G170800 SHMT5 POPTR_0005s16370 fgenesh4_pm.C_LG_V000326	Ref|XM_002307369.1|	similar to glycine hydroxymethyltransferase; putative; similar to serine hydroxymethyltransferase; putative; similar to serine/threonine aldolase; putative; similar to serine hydroxymethyltransferase (*Chlamydomonas reinhardtii*) GI:17066746...
GlyA6	POPTR_0006s24840	CTGCGCTAAGTTGATACTTG CTGTTCTTGCACCATACATG	Potri.006G232300 SHMT8 estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VI1584	Ref|XM_002309477.1|	similar to glycine hydroxymethyltransferase; putative; similar to serine hydroxymethyltransferase; putative; similar to serine/threonine aldolase; putative; similar to serine hydroxymethyltransferase (*Chlamydomonas reinhardtii*) GI:17066746...

<table>
<tr><td>GlyA8</td><td>POPTR_0008s00350</td><td>TCCGTCATGAAGTGGAAGAA
TTCGTCTCGGCAGTATGTTT</td><td>Potri.008G002900
SHMT2
Pt-SHM1.2
gw1.VIII.2633.1</td><td>Ref|XM_002310880.1|</td><td>similar to Serine hydroxymethyltransferase; similar to mitochondrial precursor (EC 2.1.2.1) (Serine methylase) (Glycine hydroxymethyltransferase) (SHMT).; [co-ortholog (2 of 3) of At4g37930]</td></tr>
<tr><td>GlyA10</td><td>POPTR_0010s26130</td><td>CCAGTGCTGAGGAAAGCAAT
GGCAGTAGAAACTCGAAAGC</td><td>Potri.010G254700
SHMT7
Pt-SHM1.3
estExt_fgenesh4_pm.C_LG_X0942</td><td>Ref|XM_002335387.1|</td><td>similar to Serine hydroxymethyltransferase; similar to mitochondrial precursor (EC 2.1.2.1) (Serine methylase) (Glycine hydroxymethyltransferase) (SHMT).; [co-ortholog (1 of 3) of At4g37930]</td></tr>
<tr><td>GlyA17</td><td>POPTR_0017s08600</td><td>TTCTTGGGATGAATGGTCCT
ATCATCACTTGCACGAAAGC</td><td>Potri.017G059300
SHMT6
Pt-SHM4.2
estExt_fgenesh4_pm.C_880008</td><td>Ref|XM_002328874.1|</td><td>similar to serine hydroxymethyltransferase 4; [co-ortholog (2 of 2) of At4g13930, At4g13890]</td></tr>
<tr><td>GlyA19</td><td>POPTR_0001s21950</td><td>GATGTACAGGTTGGTGATTG
CACCGCTGTAACAAAATCAG</td><td>Potri.001G212000
SHMT9
gw1.I.9830.1</td><td>gb|EF150645.1|</td><td></td></tr>
<tr><td>GlyA23</td><td>POPTR_0002s10990</td><td>TGCAAGGTGTGTGGATTCTT
AGATCTGCGTGGTATACATG</td><td>Potri.002G109200
SHMT3
grail3.0003095602</td><td>Ref|XM_002302321.1|</td><td></td></tr>
</table>

GlyA24	POPTR_0002s09080	GTGGGACTGATAACCATTTGT CGTCTCAAAATCAGCCTCTAT	Potri.002G090200 SHMT4 eugene3.00020834	Ref|XM_002300986.1|	similar to glycine hydroxymethyltransferase; putative; similar to serine hydroxymethyltransferase; putative; similar to serine/threonine aldolase; putative; similar to serine hydroxymethyltransferase (*Chlamydomonas reinhardtii*) GI:17066746...
GME5	POPTR_0005s05450	TAATAGCCGTGGACCTTGCT TTCCCAGATGACTGCGTAGA	Potri.005G053000 eugene3.00700070	Ref|XM_002328306.1|	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein; similar to sugar epimerase BlmG from *Streptomyces verticillus* GI:9937230; [co-ortholog (2 of 2) of At5g28840]
GME13	POPTR_0013s03790	AGCTTTTATGCCCTCATTCC TTCATCACAGACCACCAATG	Potri.013G040600 estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XIII0193	Ref|XM_002319603.1|	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein; similar to sugar epimerase BlmG from *Streptomyces verticillus* GI:9937230; [co-ortholog (1 of 2) of At5g28840]
GOGAT6	POPTR_0006s03660	TTATCGGGGAAACAGAATGC TCTCTAACAATGGGGATGCT	Potri.006G038400 Pt-GLU1.2 estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VI0304	Ref|XM_002308848.1|	similar to ferredoxin-dependent glutamate synthase. [ORG:*Securigera parviflora*]; [co-ortholog (1 of 2) of T06228, AAP33664, At2g41220, At5g04140]
GOGAT12	POPTR_0012s01860	AAGATTGGGTAGACGTGAGA GATTTTCAAGCCAGCAGGTT	Potri.012G011700 Pt-GLT1.3 eugene3.06620001	Ref|XM_002332695.1|	similar to NADH-dependent glutamate synthase. [ORG:*Medicago sativa*]; [co-ortholog (2 of 3) of At5g53460, AAB41904]

<table>
<tr><td>GOGAT15</td><td>POPTR_0015s01950</td><td>TGGGGACTTGGAATGATTGA
AGCAAGCTGGTTGAAAGCTA</td><td>Potri.015G017500
Pt-GLT1.2
estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XV0172</td><td>Ref|XM_002321400.1|</td><td>similar to NADH-dependent glutamate synthase. [ORG:Medicago sativa]; [co-ortholog (1 of 3) of At5g53460, AAB41904]</td></tr>
<tr><td>GOGAT16</td><td>POPTR_0016s03630</td><td>CCCCAACCTGTACAGATCAA
GGATGCTCTTGGGTGATGTT</td><td>Potri.016G036900
Pt-GLU1.1
estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XVI0276</td><td>Ref|XM_002322587.1|</td><td>similar to ferredoxin-dependent glutamate synthase. [ORG:Securigera parviflora]; [co-ortholog (2 of 2) of T06228, AAP33664, At2g41220, At5g04140]</td></tr>
<tr><td>GS4</td><td>POPTR_0004s08380</td><td>AACCTCAACAAGCCCCTCTT
GAACTCACTTGCTGCCTCAA</td><td>Potri.004G085400
Pt-CYTGS.4
estExt_fgenesh4_pm.C_LG_IV0266</td><td>Ref|XM_002305849.1|</td><td>similar to glutamate-ammonia ligase (EC 6.3.1.2) gamma; similar to cytosolic - kidney bean. [ORG:Phaseolus vulgaris]; [co-ortholog (2 of 5) of JQ0937, AAB23379, P08282, S62712, AAQ01729, AAP20795, AAB03492, AAD52008, 1211328A, P00965, AJFBQ, CAA63963, ...]</td></tr>
<tr><td>GS5</td><td>POPTR_0005s09610</td><td>CTTCAATGATCGCCGAAACC
GGTTGAGAGAGGAGCAGTTT</td><td>Potri.005G093200
Pt-NCPGS.4
estExt_Genewise1_v1.C_LG_V3325</td><td>Ref|XM_002306349.1|</td><td>similar to glutamine synthetase. [ORG:Glycine falcata]; [co-ortholog (7 of 8) of AAM71227, AAR05531, AAP51252, AAR05559, AAR05552, AAM71209, AAM71231, AAR05581, AAR05506, AAP51256, AAO41677, AAO41668, AAC37356, AAM71193, AAM71233, AAR05523, AAO41662, AAR05,...]</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td>GS7</td><td>POPTR_0007s07960</td><td>TGATGGCTTGCATTTCATTCT
ACAGGAGGAGGATATGTTCA</td><td>Potri.007G069600
Pt-NCPGS.5
POPTR_0007s07970
estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0739</td><td>Ref|XM_002310630.1|</td><td>similar to glutamine synthetase. [ORG:Glycine falcata]; [co-ortholog (6 of 8) of AAM71227, AAR05531, AAP51252, AAR05559, AAR05552, AAM71209, AAM71231, AAR05581, AAR05506, AAP51256, AAO41677, AAO41668, AAC37356, AAM71193, AAM71233, AAR05523, AAO41662, AAR05, ...]</td></tr>
<tr><td>GS8</td><td>POPTR_0008s20460</td><td>CGCATGGGAAACTTCTCTCT
CCACGGGATGTCTTCAATCT</td><td>Potri.008G200100
Pt-NCPGS.8
estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VIII1790</td><td>Ref|XM_002312697.1|</td><td>similar to glutamine synthetase. [ORG:Glycine falcata]; [co-ortholog (4 of 8) of AAM71227, AAR05531, AAP51252, AAR05559, AAR05552, AAM71209, AAM71231, AAR05581, AAR05506, AAP51256, AAO41677, AAO41668, AAC37356, AAM71193, AAM71233, AAR05523, AAO41662, ...]</td></tr>
<tr><td>GS10</td><td>POPTR_0010s03010</td><td>TAAAGACCCTGGTGTGGATT
GGTCCAAAACAGTGATGGTT</td><td>Potri.010G029100
Pt-NCPGS.7
estExt_Genewise1_v1.C_LG_X4165</td><td>Ref|XM_002314390.1|</td><td>similar to glutamine synthetase. [ORG:Glycine falcata]; [co-ortholog (3 of 8) of AAM71227, AAR05531, AAP51252, AAR05559, AAR05552, AAM71209, AAM71231, AAR05581, AAR05506, AAP51256, AAO41677, AAO41668, AAC37356, AAM71193, AAM71233, AAR05523, AAO41662, ...]</td></tr>
</table>

<table>
<tr><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th></tr>
<tr><td>GS12</td><td>POPTR_0012s04090</td><td>TGCCTCTTCGTTGTCCATTT
CCAGCTCTACCAAATTTCAC</td><td>Potri.012G043900
Pt-NCPGS.6
estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XII0003</td><td>Ref|XM_002318269.1|</td><td>similar to glutamine synthetase. [ORG:Glycine falcata]; [co-ortholog (8 of 8) of AAM71227, AAR05531, AAP51252, AAR05559, AAR05552, AAM71209, AAM71231, AAR05581, AAR05506, AAP51256, AAO41677, AAO41668, AAC37356, AAM71193, AAM71233, AAR05523, AAO41662, ...]</td></tr>
<tr><td>GS15</td><td>POPTR_0015s05010</td><td>GGATTTCTGAATGCCCAATG
TCCCAACTATCTTCCAACAG</td><td>Potri.015G034700
Pt-NCPGS.3
estExt_fgenesh4_pg.C_1220090</td><td>Ref|XM_002329679.1|</td><td>similar to glutamine synthetase. [ORG:Glycine falcata]; [co-ortholog (1 of 8) of AAM71227, AAR05531, AAP51252, AAR05559, AAR05552, AAM71209, AAM71231, AAR05581, AAR05506, AAP51256, AAO41677, AAO41668, AAC37356, AAM71193, AAM71233, AAR05523, AAO41662, AAR05, ...]</td></tr>
<tr><td>GS17</td><td>POPTR_0017s02770</td><td>CGGAAGGATTTGAGTCAGTA
GAAATCTGGGCATCCATGAA</td><td>Potri.017G131100
Pt-CYTGS.5
estExt_Genewise1_v1.C_LG_II2125</td><td>gb|EF147238.1|</td><td>similar to glutamate-ammonia ligase (EC 6.3.1.2) gamma; similar to cytosolic - kidney bean. [ORG:Phaseolus vulgaris]; [co-ortholog (1 of 5) of JQ0937, AAB23379, P08282, S62712, AAQ01729, AAP20795, AAB03492, AAD52008, 1211328A, P00965, AJFBQ, CAA63963, ...]</td></tr>
</table>

GSH11	POPTR_0001s09340	ATTTCGGGGTGGACTGTTGA ACCTGTGCTAACCACATCAG	Potri.001G104500 estExt_Genewise1_v1.C_LG_I8937	Ref|XM_002297999.1|	
GSH13	POPTR_0003s12700	TTTGGGTGTAAGCCTTGTTC ATCCGGGTGTATTCAATGAG	Potri.003G126900	Ref|XM_002304457.1|	
GSH213	POPTR_0013s02780	GCCTGATCTCTTTGTGATGA TGGGCGAAACCATAGGAAAA	Potri.013G026800		
GSH25	POPTR_0005s04040	GCCCGAGCTATTTGTGATGA GGGTGAAACAGCAGGAAAGA	Potri.005G038100		
GT3	POPTR_0003s07020	GGATGAGTTTCGCGATTGAA AAGGTAACATCCATCGTTGTA	Potri.003G072600	Ref|XM_002304219.1|	
GT6	POPTR_0006s10740	TGTTTTCAGAATTACACCTCCA CGGGCCAGTTTGTGAATGAT	Potri.006G106800 gw1.VI.969.1	Ref|XM_002309139.1|	similar to alanine-glyoxylate aminotransferase; putative; similar to beta-alanine-pyruvate aminotransferase; putative; similar to AGT; putative; similar to similar to SP|Q64565|Alanine glyoxylate-aminotransferase 2 ; similar to mitochondrial precursor ...
GT7	POPTR_0007s06190	GCATAGCTGATGAGGTGCAA TGCCAATGCCCTTTGCCATA	Potri.007G085600 Pt-AGT2.1 gw1.VII.1999.1	Ref|XM_002310555.1|	similar to alanine:glyoxylate aminotransferase 2; [co-ortholog (1 of 2) of At4g39660]
GT8	POPTR_0008s19160	ATTGGGCAGTTCAAGCCTTT CAGGTATTCATGCAGACGAT	Potri.008G187400 Pt-AOAT1.2 eugene3.00081764	Ref|XM_002312643.1|	similar to alanine-2-oxoglutarate aminotransferase 1; [co-ortholog (1 of 2) of At1g70580, At1g23310]

GT10	POPTR_0010s05530	CAATCGACTGGATGAATGTG GTAGCTAGCTCATCAGACTA	Potri.010G045100	Ref|XM_002315639.1|	
GT16	POPTR_0016s13970	CCTACTGGTTGATCATATGC AGTAAGAACCCAAAGAGAGG	Potri.016G132200 Pt-AGT3.1 estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XVI0476	Ref|XM_002323619.1|	similar to alanine:glyoxylate aminotransferase 3; [ortholog of At2g38400]
LGalDH1	POPTR_0001s29390	GCTGATGGATCCAAAGTTCA GCGGAAAATGAAGGATTGAC	Potri.001G287100 estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I2703	Ref|XM_002298766.1|	similar to L-galactose dehydrogenase (L-GalDH); similar to L-galactose dehydrogenase (*Arabidopsis thaliana*) GI:16555790; similar to L-fucose dehydrogenase (*Pseudomonas sp.*) GI:829054; similar to aldo/keto reductase family; [co-ortholog (2 of 2) of At4g3367...]
LGalDH9	POPTR_0009s08490	GGCTCTCCAATCCATATTTG TTGAGTTTCGGATCCATCAG	Potri.009G081300 estExt_fgenesh4_pm.C_LG_IX0390	Ref|XM_002313170.1|	similar to L-galactose dehydrogenase (L-GalDH); similar to L-galactose dehydrogenase (*Arabidopsis thaliana*) GI:16555790; similar to L-fucose dehydrogenase (*Pseudomonas sp.*) GI:829054; similar to aldo/keto reductase family; [co-ortholog (1 of 2) of At4g3367...]

<table>
<tr><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th></tr>
<tr><td>THA13</td><td>POPTR_0013s04350</td><td>CAGGTGGTTGTTCAGTGAAA
CAGAGATCGCTTTTGGACTT</td><td>Potri.013G046400
estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIII1664</td><td>Ref|XM_002319070.1|</td><td>similar to L-allo-threonine aldolase-related; similar to L-allo-threonine aldolase (EC 4.1.2) (L-allo-TA) (L-allo-threonine acetaldehyde-lyase) (SP:O07051) {{Aeromonas jandaei}}; similar to ESTs gb|R30517|; similar to gb|T42772; similar to gb|R90493; ...</td></tr>
<tr><td>THA19</td><td>POPTR_0019s03530</td><td>TACGCACTCTCCTGCTTTAA
GACCATGAGTTGACTTGAGA</td><td>Potri.019G018500
estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XIX0195</td><td>Ref|XM_002325298.1|</td><td>similar to L-allo-threonine aldolase-related; similar to L-allo-threonine aldolase (EC 4.1.2.-) (L-allo-TA) (L-allo-threonine acetaldehyde-lyase) (SP:O07051) {{Aeromonas jandaei}}; similar to ESTs gb|R30517|; similar to gb|T42772; similar to gb|R90493; ...</td></tr>
<tr><td>UBL</td><td>POPTR_0005s22060</td><td>TGAGGCTTAGGGGAGGAACT
TGTAGTCGCGAGCTGTCTTG</td><td>Potri.005G198700
Pt-SUBI.4
estExt_Genewise1_v1.C_LG_V0494</td><td>Ref|XM_002306689.1|</td><td>similar to polyubiquitin. [ORG:Cucumis melo]; [co-ortholog (10 of 11) of CAA10056, CAA38256, P03993, BAA76429, BAA05670, AAQ08998, AAL33551, AAF31707, BAA85750, AAP31578, AAF70460, AAQ08999, BAA05085, CAA06197]</td></tr>
<tr><td>VTC21</td><td>POPTR_0001s36560</td><td>CCTGGTGTGGATTGTTATGT
AGATGCTCAAGTTCCACAAG</td><td>Potri.001G355600
Pt-VTC2.2
grail3.0032000401</td><td>Ref|XM_002298780.1|</td><td>similar to vitamin c defective 2; [co-ortholog (1 of 2) of At5g55120, At4g26850]</td></tr>
</table>

VTC211	POPTR_0011s08940	CACTAGTGTGTTTGTGGATTA CCCATGCAGTACATACAAAG	Potri.011G087200 Pt-VTC2.1 grail3.0062001301	Ref|XM_002316719.1|	similar to vitamin c defective 2; [co-ortholog (2 of 2) of At5g55120, At4g26850]
VTC25	POPTR_0005s14440	TATTGGAAGCAGCAGGCTTT ACCATGCAATCTTGGGGTAA	Potri.017G126100 eugene3.00002305	Ref|XM_002302931.1|	
VTC46	POPTR_0006s01600	CTGAGAGTCTTCCAATTGCT AGGCATGCTTTCTGCTCAAT	Potri.006G014900 estExt_Genewise1_v1.C_LG_VI0423	Ref|XM_002307859.1|	similar to inositol-1(or 4)-monophosphatase; putative; similar to inositol monophosphatase; putative; similar to IMPase; putative; similar to SP|P54928|Inositol 1-(or 4 monophosphatase)-3 EC (3 1.3.25.IMPase) (3 IMP) (3 Inositol) ...
VTC416	POPTR_0016s01220	TGAGAGAGTGGCAACATCAA GTGGTCTGCATGATCAACAA	Potri.016G011000	Ref|XM_002323105.1|	
VTC4162	POPTR_0016s01230	TGAGGTTTTGCAGCAATCAG TCTCTCAGTTTCTTTAAGCCT	Potri.010G156300	Ref|XM_002337620.1|	

Table S2

ANOVA, the main effects, and significant interactions of genotype, O_3 treatment and sampling date on the concentrations of ascorbate (total, reduced form oxidized form and redox ratio)

DF: Degrees of Freedom

Metabolite name	DF	F-value	p-value
Total ascorbate (ASA+DHA)			
Genotype	2	40.310	<0.0001
Treatment	1	44.752	<0.0001
Time	4	4.315	0.003
Genotype x time	4	9.977	<0.0001
Reduced ascorbate (ASA)			
Genotype	2	10.3582	0.0001
Treatment	1	8.1068	0.0056
Time	4	5.4790	0.0006
Genotype x time	8	4.1325	0.0004
Treatment x time	4	6.2252	0.0002
Genotype x treatment x time	10	2.5310	0.0107
Oxidized ascorbate (DHA)			
Genotype	2	76.9992	<0.0001
Treatment	1	3.7923	0.0554
Time	4	8.3456	<0.0001
Genotype x treatment	2	5.5870	0.0056
Genotype x time	8	5.0058	0.0001
Genotype x treatment x time	12	2.3456	0.0134
Redox ratio (ASA/(ASA+DHA))			
Genotype	2	23.4853	<0.0001
Treatment	1	0.8656	0.3553
Time	4	6.3915	0.0002
Genotype x time	8	3.7001	0.0012
Treatment x time	4	2.8703	0.0290
Genotype x treatment x time	10	2.5797	0.0100

Table S3

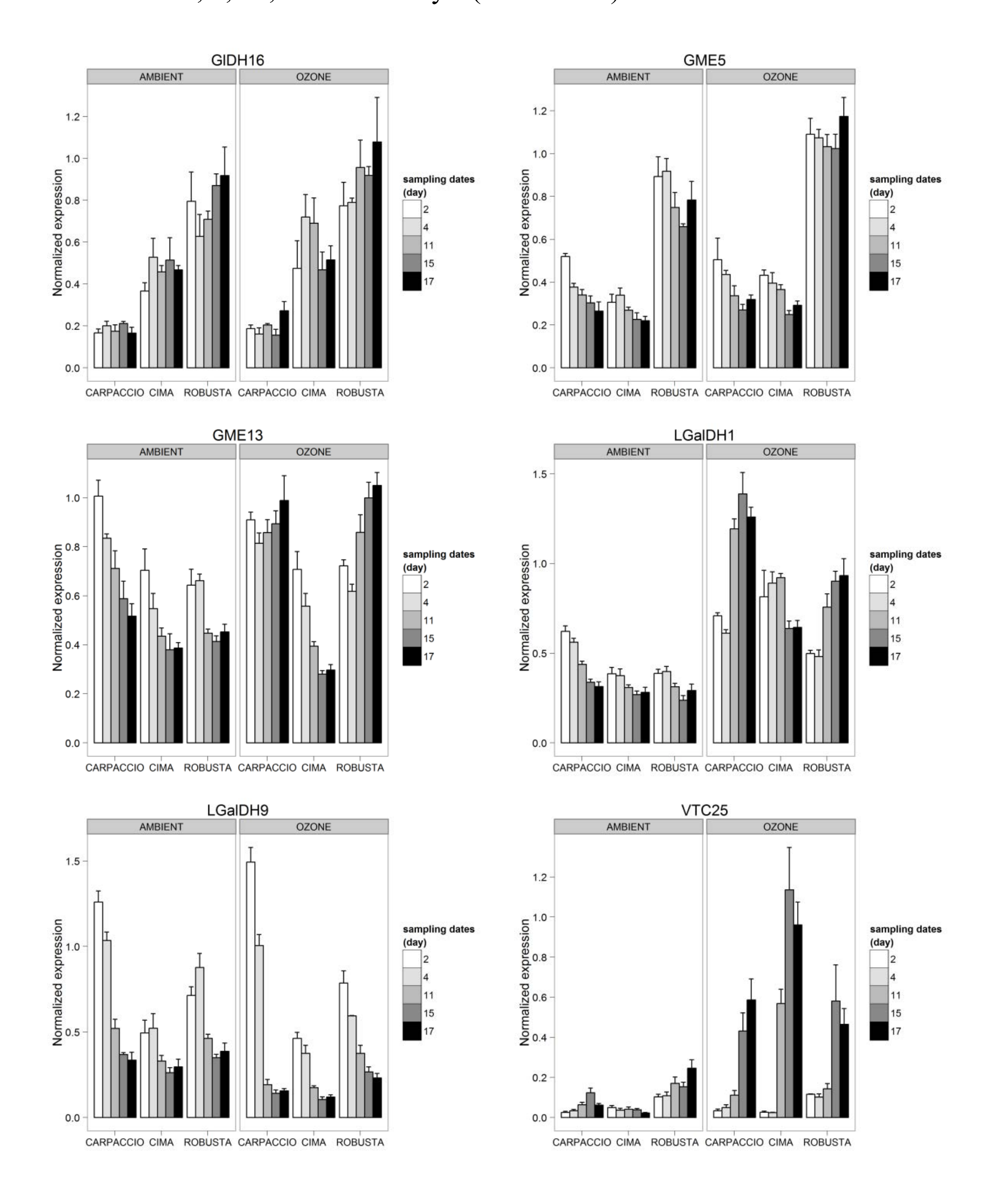
ANOVA, the main effects, and significant interactions of genotype, O_3 treatment and sampling date on the concentrations of glutathione (total, reduced form oxidized form and redox ratio)

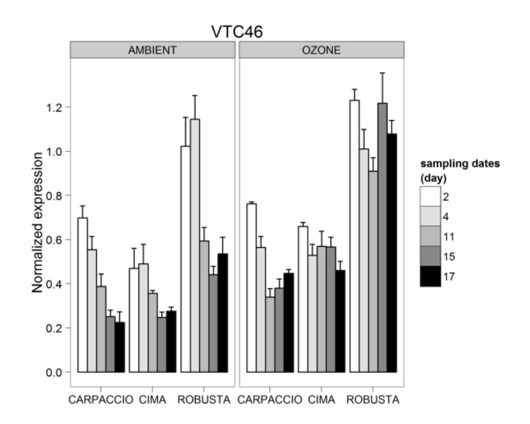
DF: Degrees of Freedom

Metabolite name	**DF**	**F-value**	**p-value**
Total glutathione (GSSG+GSH)			
Genotype	2	54.474	<0.0001
Treatment	1	279.081	<0.0001
Time	4	14.622	<0.0001
Treatment x time	4	10.790	<0.0001
Reduced glutathione (GSH)			
Genotype	2	20.348	<0.0001
Treatment	1	99.539	<0.0001
Time	4	4.349	0.0029
Treatment x time	4	4.777	0.0015
Oxidized glutathione (GSSG)			
Genotype	2	34.803	<0.0001
Treatment	1	158.216	<0.0001
Time	4	8.115	<0.0001
Treatment x time	4	7.447	<0.0001
Redox ratio (GSH/(GSH+GSSG))			
Genotype	2	1.2317	0.2963
Treatment	1	2.7861	0.0983
Time	4	0.1552	0.9602

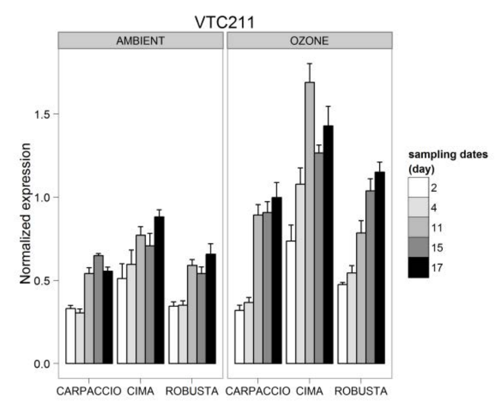
Figure S1

Normalized expression of genes involved in Ascorbate biosynthesis in leaves of three poplar genotypes (Carpaccio, Cima and Robusta) exposed to ambient or ozone treatment at 2, 4, 11, 15 and 17 days. (Mean ± SE)

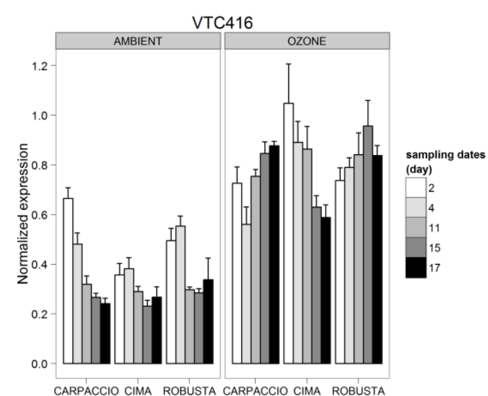




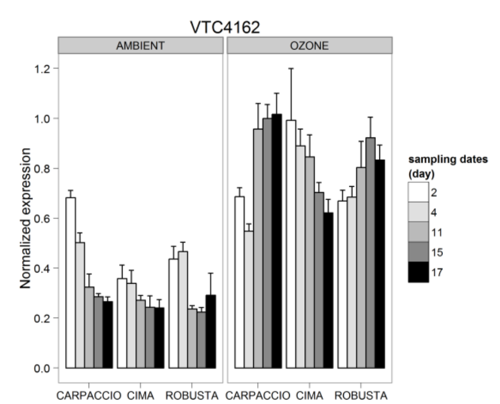
VTC46
AMBIENT
OZONE
Normalized expression
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
CARPACCIO
CIMA
ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17



VTC211
AMBIENT
OZONE
Normalized expression
0.0
0.5
1.0
1.5
CARPACCIO
CIMA
ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17



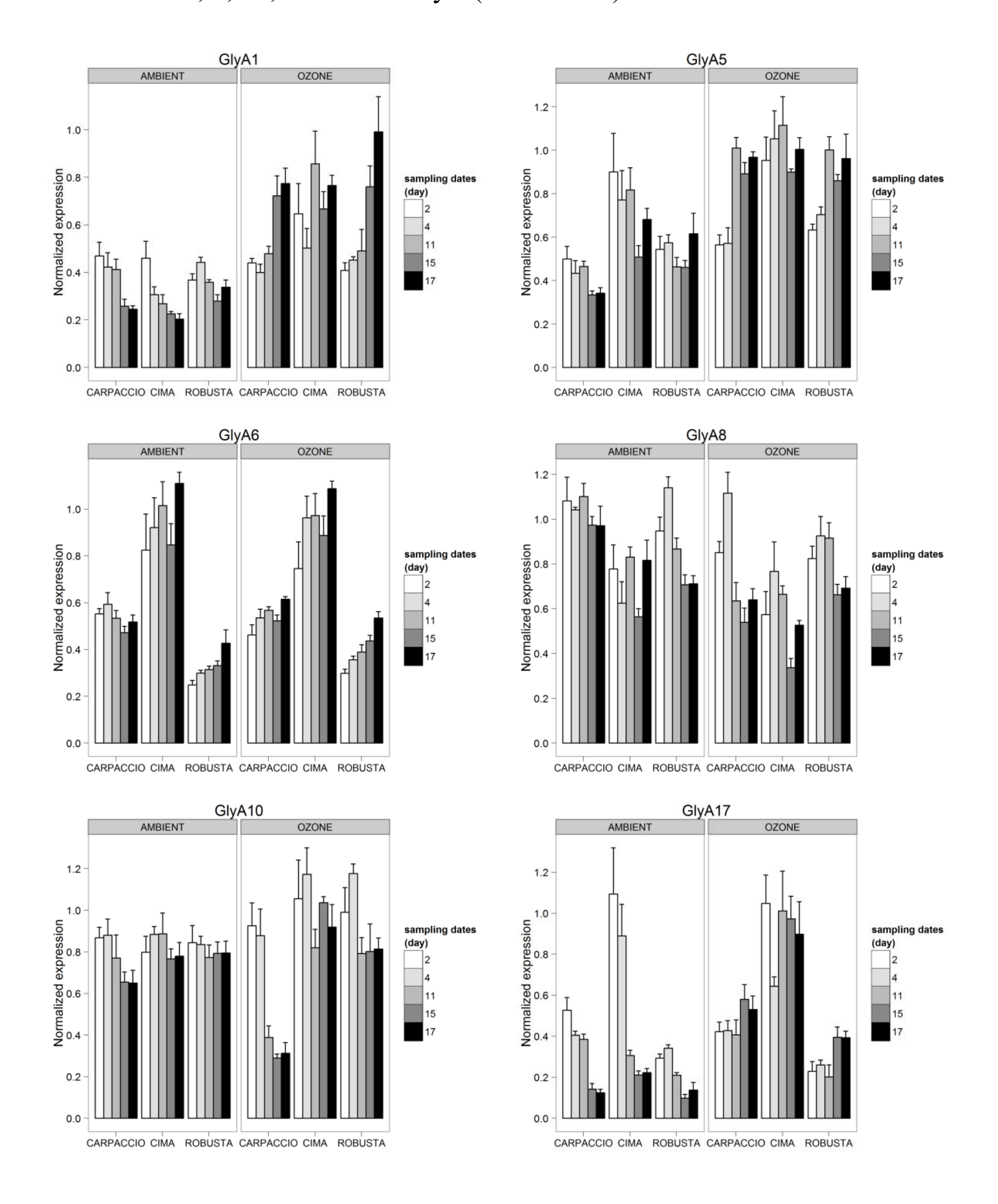
VTC416
AMBIENT
OZONE
Normalized expression
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
CARPACCIO
CIMA
ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17

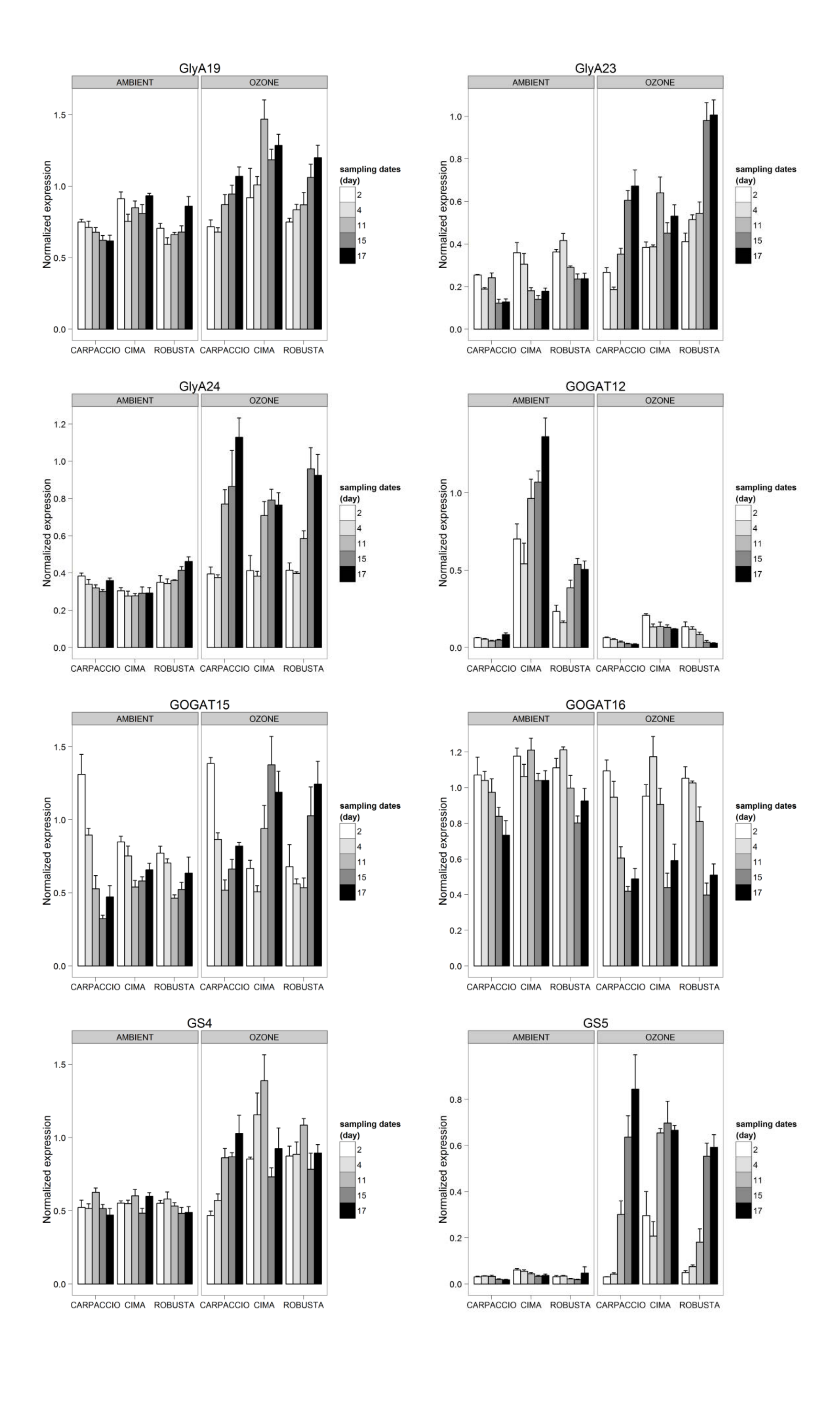


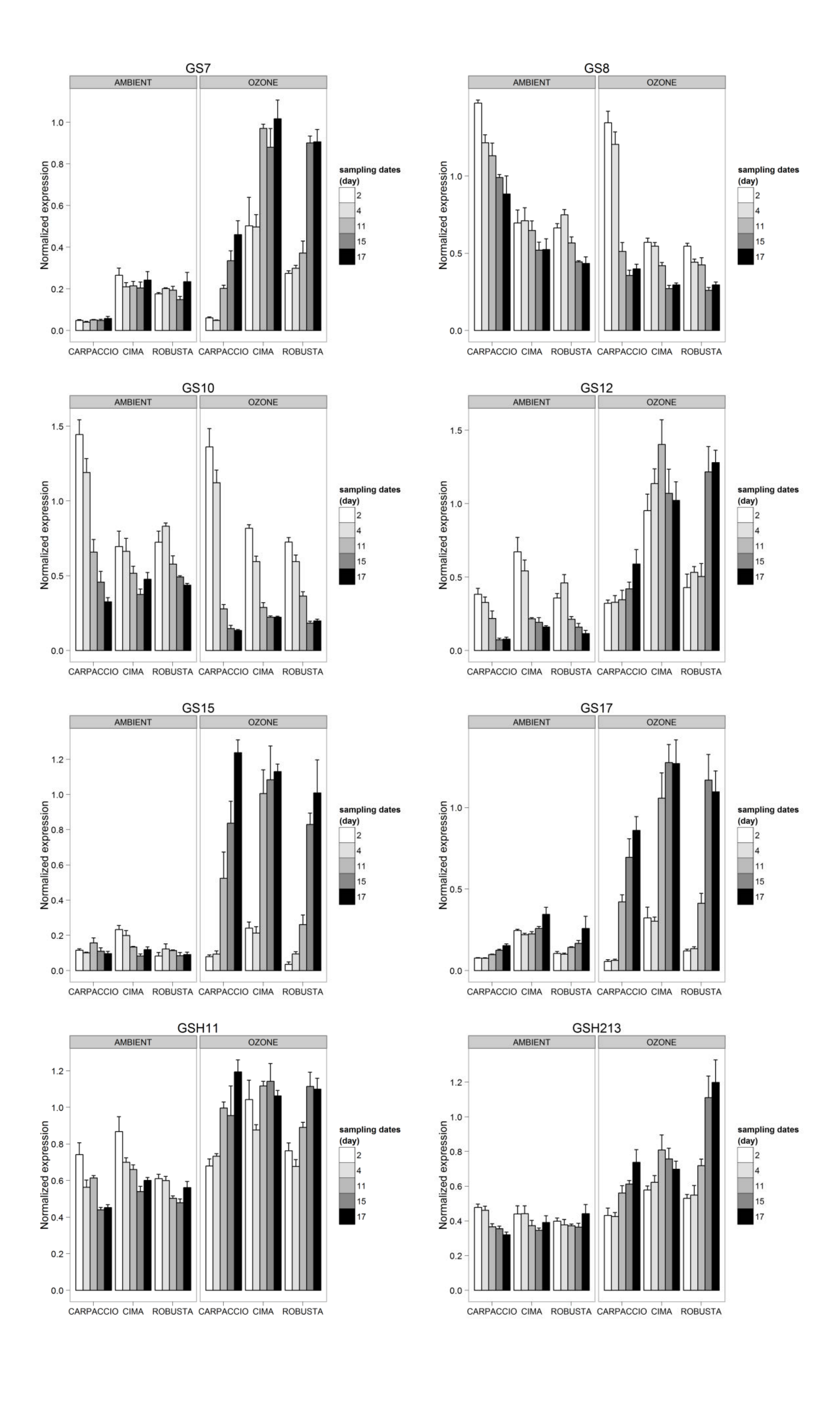
VTC4162
AMBIENT
OZONE
Normalized expression
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
CARPACCIO
CIMA
ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17

Figure S2

Normalized expression of genes involved in glutathione biosynthesis in leaves of three poplar genotypes (Carpaccio, Cima and Robusta) exposed to ambient or ozone treatment at 2, 4, 11, 15 and 17 days. (Mean ± SE)




GlyA19
GlyA23
GlyA24
GOGAT12
GOGAT15
GOGAT16
GS4
GS5
AMBIENT
OZONE
Normalized expression
sampling dates (day)
2
4
11
15
17
CARPACCIO
CIMA
ROBUSTA


GS7
GS8
GS10
GS12
GS15
GS17
GSH11
GSH213
AMBIENT
OZONE
Normalized expression
sampling dates (day)
2
4
11
15
17
CARPACCIO
CIMA
ROBUSTA

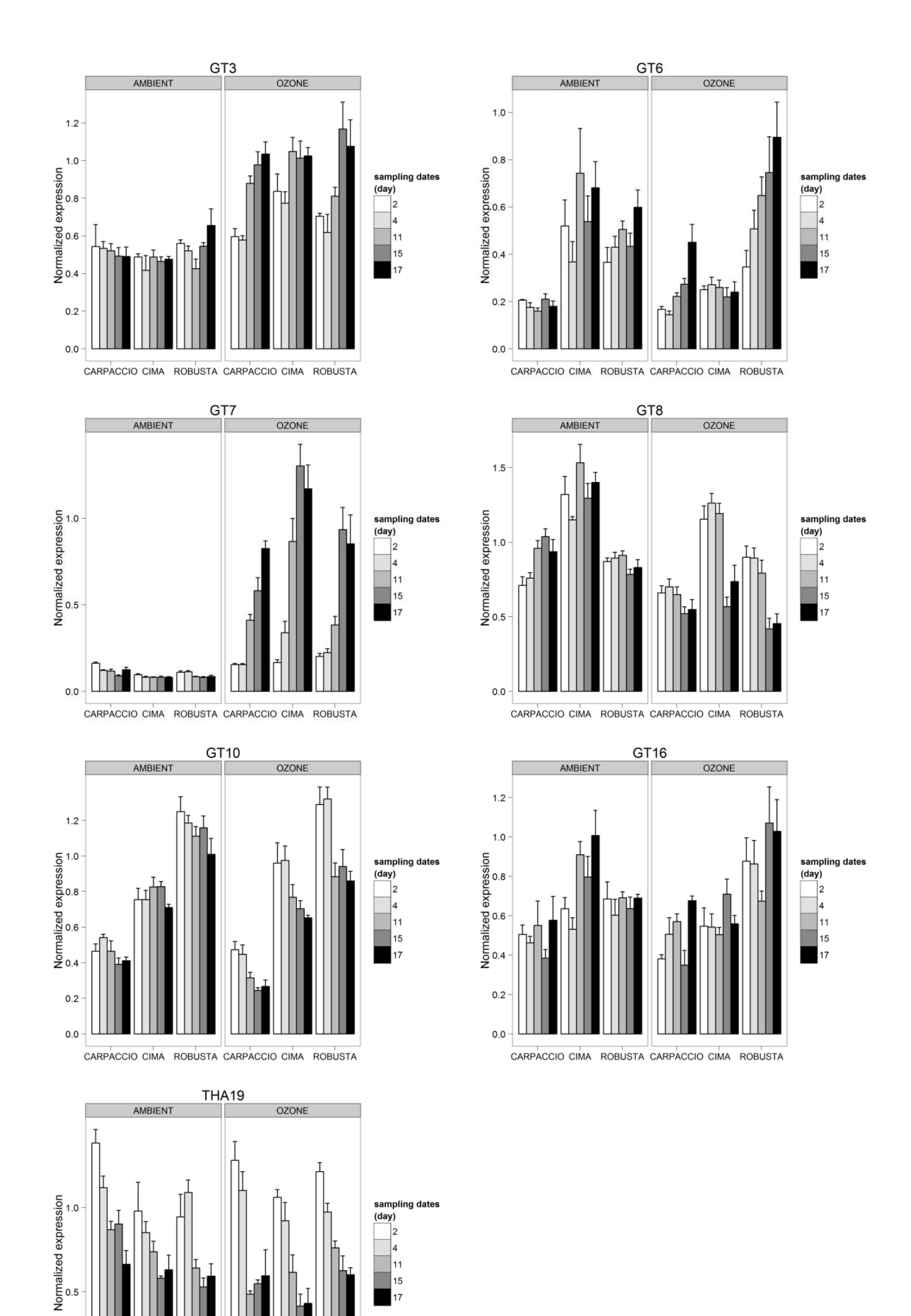
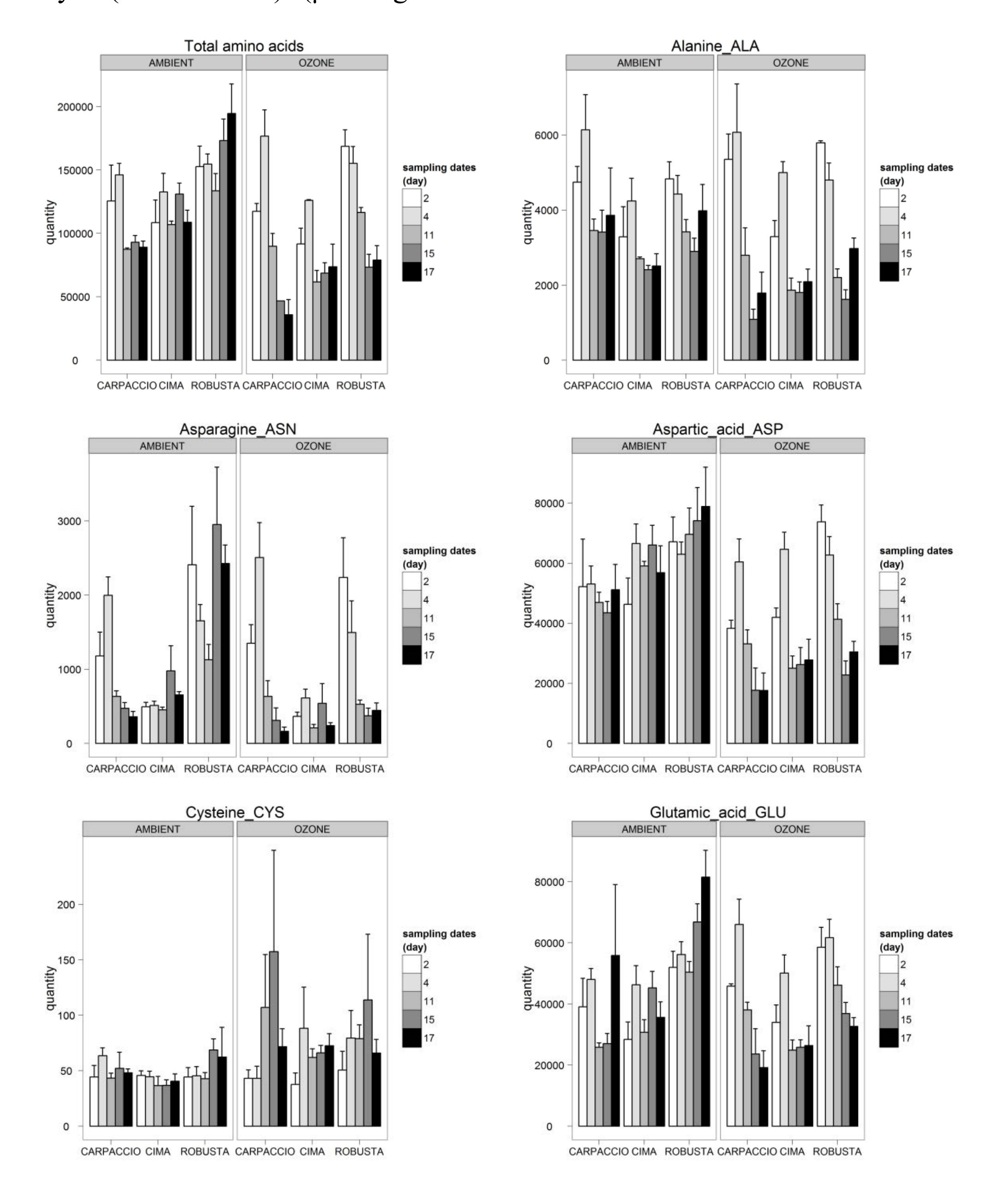
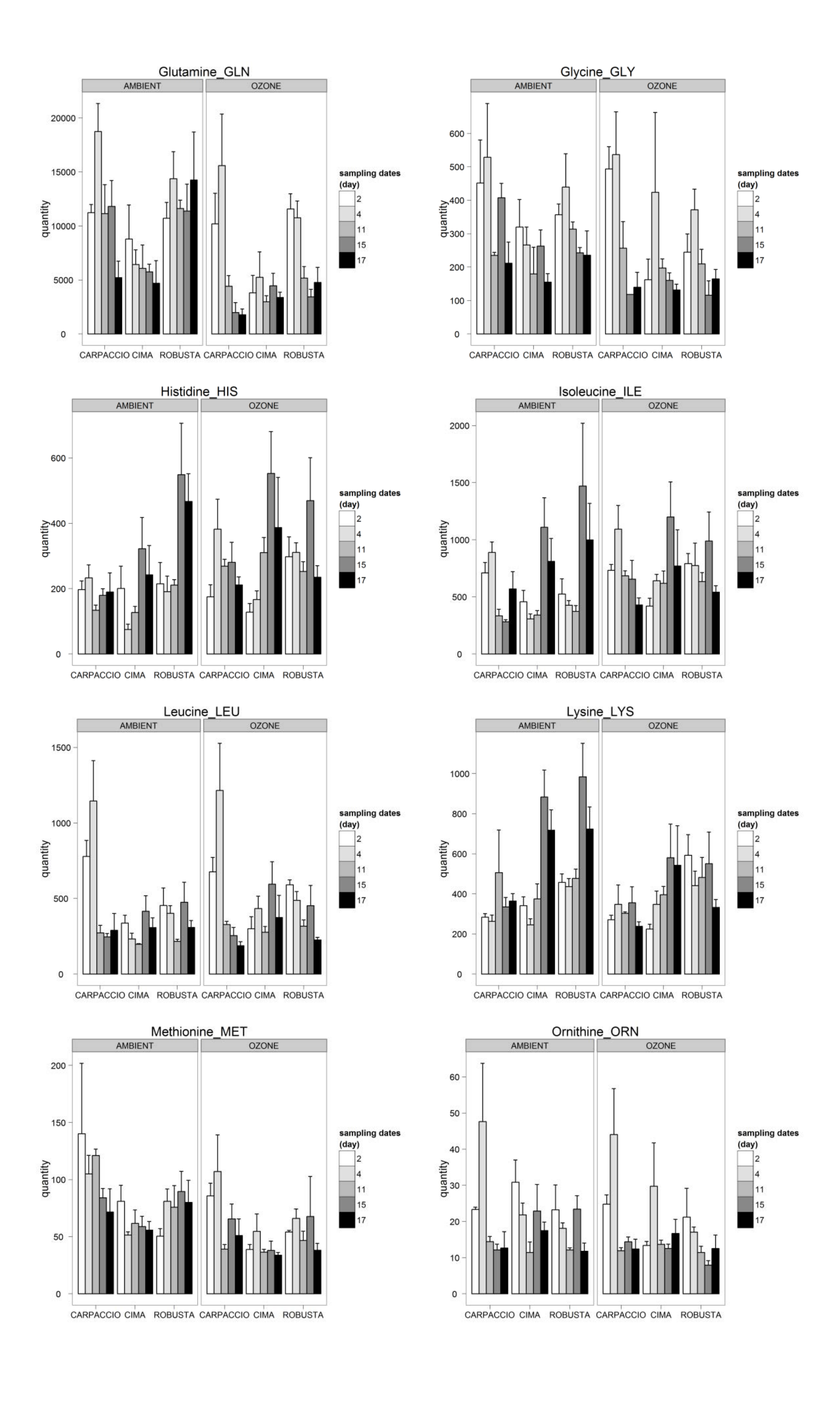

GT3
AMBIENT
OZONE
Normalized expression
sampling dates (day)
2
4
11
15
17
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
GT6
GT7
GT8
GT10
GT16
THA19

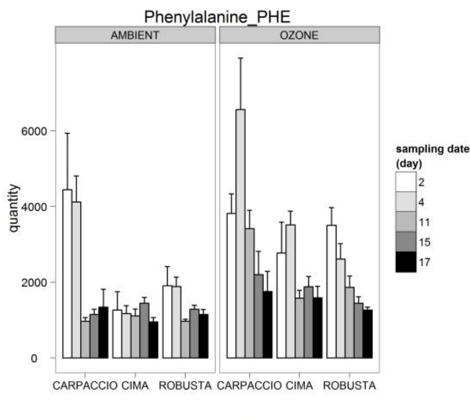
Figure S3

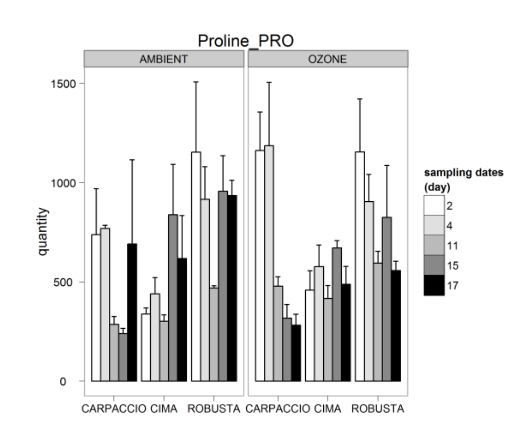
Amino acids and polyamines content in leaves of three poplar genotypes (Carpaccio, Cima and Robusta) exposed to ambient or ozone treatment at 2, 4, 11, 15 and 17 days. (Mean ± SE) (μmol g^{-1} DW with alanine-d4 as the internal standard)

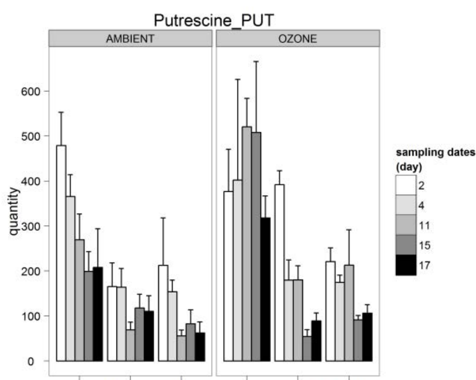


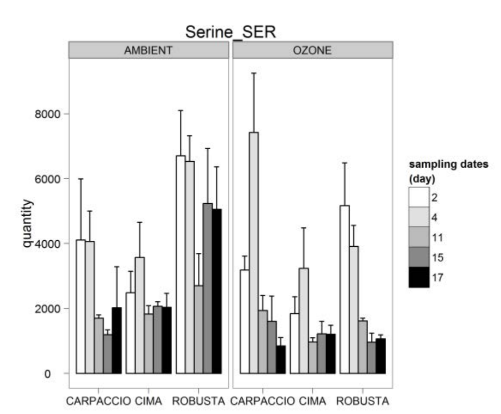


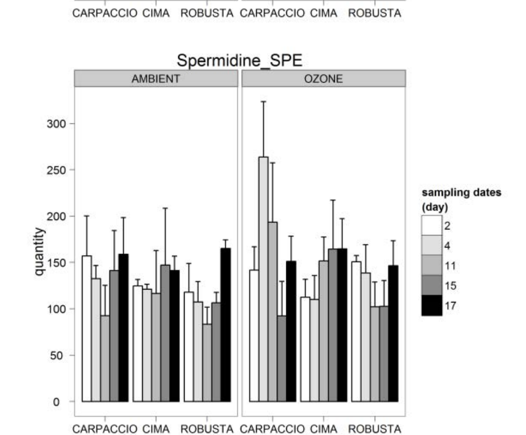
Glutamine_GLN
Glycine_GLY
Histidine_HIS
Isoleucine_ILE
Leucine_LEU
Lysine_LYS
Methionine_MET
Ornithine_ORN
AMBIENT
OZONE
quantity
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17

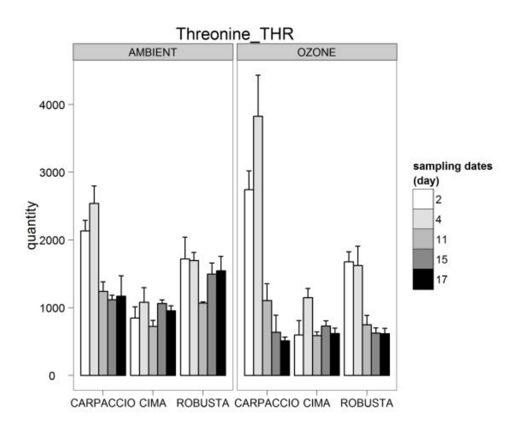

Phenylalanine_PHE
AMBIENT
OZONE
quantity
0
2000
4000
6000
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17

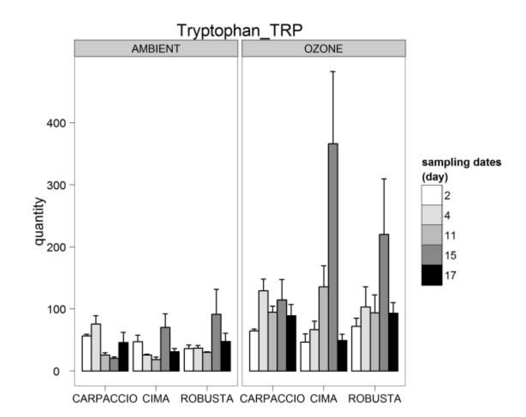

Proline_PRO
AMBIENT
OZONE
quantity
0
500
1000
1500
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17

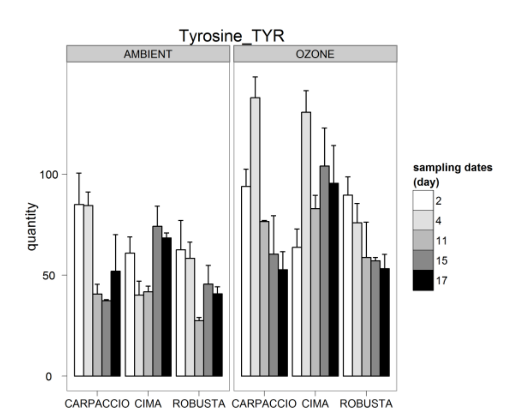

Putrescine_PUT
AMBIENT
OZONE
quantity
0
100
200
300
400
500
600
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17

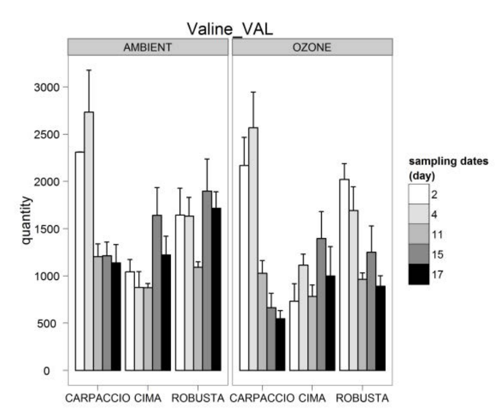

Serine_SER
AMBIENT
OZONE
quantity
0
2000
4000
6000
8000
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17

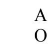

Spermidine_SPE
AMBIENT
OZONE
quantity
0
50
100
150
200
250
300
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17


Threonine_THR
AMBIENT
OZONE
quantity
0
1000
2000
3000
4000
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17


Tryptophan_TRP
AMBIENT
OZONE
quantity
0
100
200
300
400
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17


Tyrosine_TYR
AMBIENT
OZONE
quantity
0
50
100
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17


Valine_VAL
AMBIENT
OZONE
quantity
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
CARPACCIO CIMA ROBUSTA CARPACCIO CIMA ROBUSTA
sampling dates (day)
2
4
11
15
17



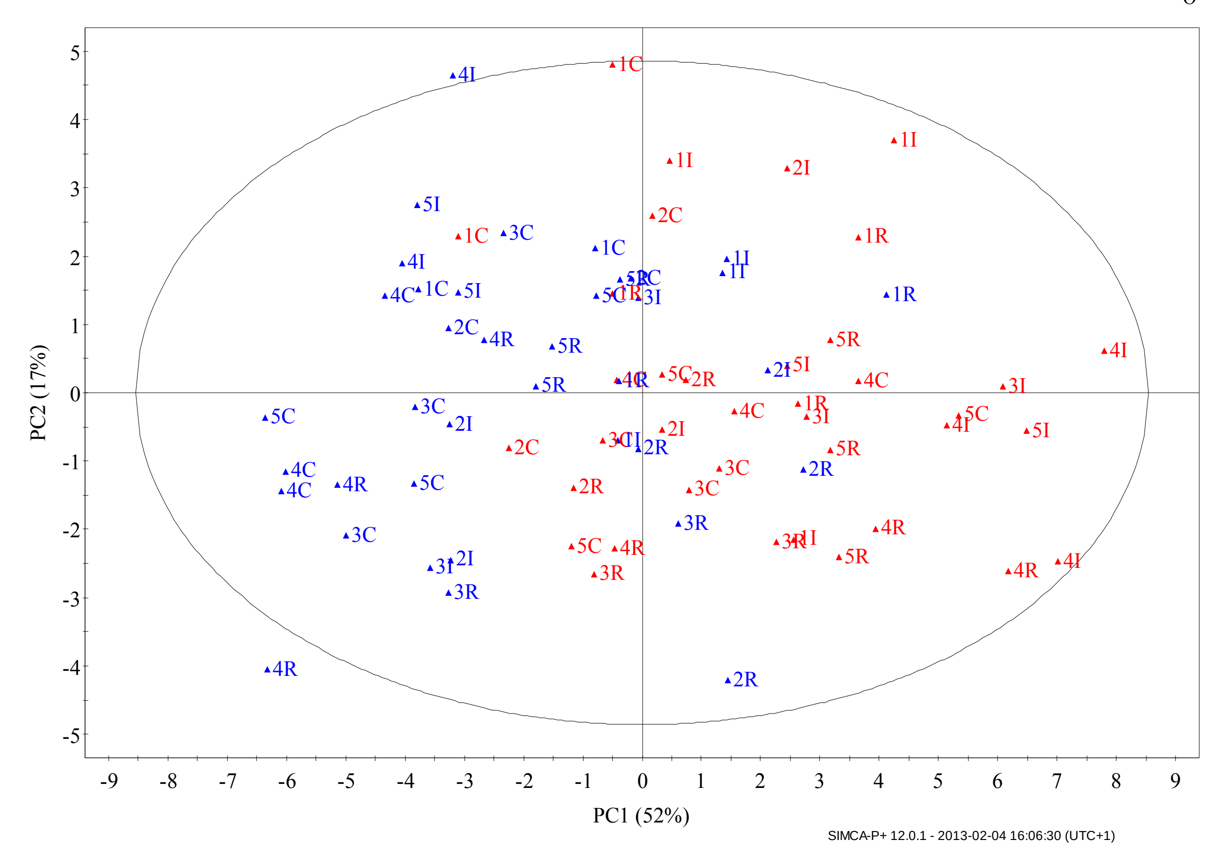


Figure 47: Analyse en composantes principales basée sur les concentrations des caroténoïdes, des chlorophylles et des terpénols. En rouge, le traitement control ; en bleu, le traitement ozone. Les échantillons sont représentés par un chiffre correspondant aux prélèvements (1, 2, 3, 4, 5 pour 2, 4, 11, 15 et 17 jours de traitement respectivement) et une lettre pour le génotype (C, I R pour Carpaccio, Cima et Robusta respectivement)

2. Effets de l'ozone sur les concentrations en composes phenoliques et en carotenoïdes

L'ascorbate et le glutathion sont deux acteurs majeurs du processus de détoxication, mais d'autres métabolites sont capables de détoxiquer les ROS produits par l'ozone. Parmi ces métabolites, on peut citer les composés phénoliques et les caroténoïdes. En effet, les composés phénoliques sont connus comme représentant des composés de défense importants contre les dommages dus à l'ozone. Il a été montré chez différentes espèces qu'ils s'accumulaient en réponse à l'ozone chez *Betula pendula* Roth (Saleem *et al.*, 2001); chez *Populus tremula* x *tremuloides* (Häikiö *et al.*, 2009) et chez *Trifolium pratense* L. (Saviranta *et al.*, 2009). Or, nous avons pu voir précédemment que la remobilisation des acides aminés était favorable à la voie de synthèse de ces composés. Les caroténoïdes quant à eux, peuvent agir comme antioxydants par oxydation du radical anion superoxyde et enrayer ainsi la production d'autres ROS (Galano *et al.*, 2010 ; Han *et al.*, 2012).

Afin de confirmer, chez nos trois génotypes de peuplier euraméricain, s'il existait la même augmentation des concentrations en composés phénoliques et en caroténoïdes, et afin d'étudier leur rôle potentiel dans leur différence de sensibilité, nous avons conduit une analyse métabolomique ciblée de ces composés.

Lors de l'extraction et l'analyse des caroténoïdes, les chlorophylles a et b, ainsi que des terpénols, ont été extraits. Comme le montre la figure 47, l'ozone a un fort effet sur les caroténoïdes, les chlorophylles et les terpénols. En effet, une analyse en composante principale permet de mettre en avant l'importance du traitement à l'ozone qui explique plus de 50% de la variance des échantillons (PC1). D'une manière générale, le génotype le plus résistant, Carpaccio, se caractérise par des concentrations en chlorophylles et en caroténoïdes légèrement plus faibles que les deux autres génotypes (Fig. 48a,b). Néanmoins, en réponse à l'ozone on observe une baisse de ces composés chez les trois génotypes (Fig. 48). Les différences de sensibilité à l'ozone entre nos génotypes ne sont donc pas liées aux concentrations en caroténoïdes, en chlorophylles ou en terpénols.

L'analyse des composés phénoliques a mis en avant une différence très nette dans le profil de concentrations en composés phénoliques entre génotype, en particulier chez Cima (Fig. 49). En effet, les trois premières composantes séparent nettement les trois génotypes et

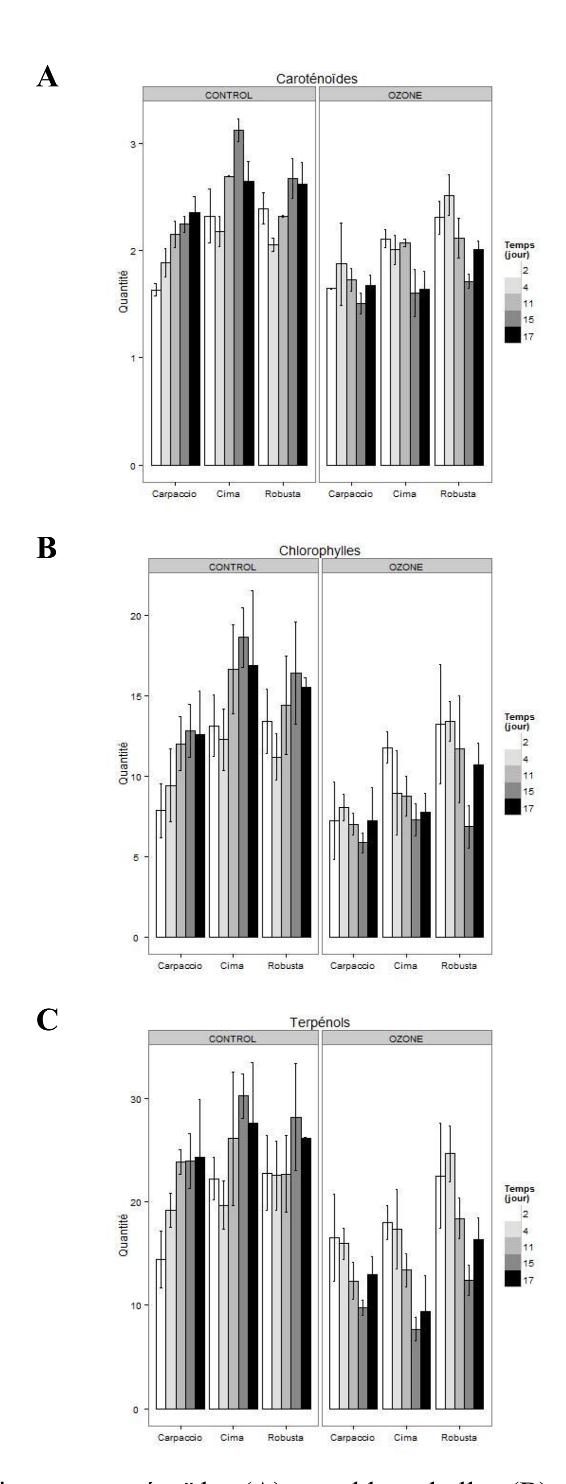


Figure 48 : Concentration en caroténoïdes (A), en chlorophylles (B) et en terpénols (C) dans trois génotypes de peuplier, Carpaccio, Cima et Robusta après 2, 4, 11, 15 et 17 jours de traitement ozone ou control

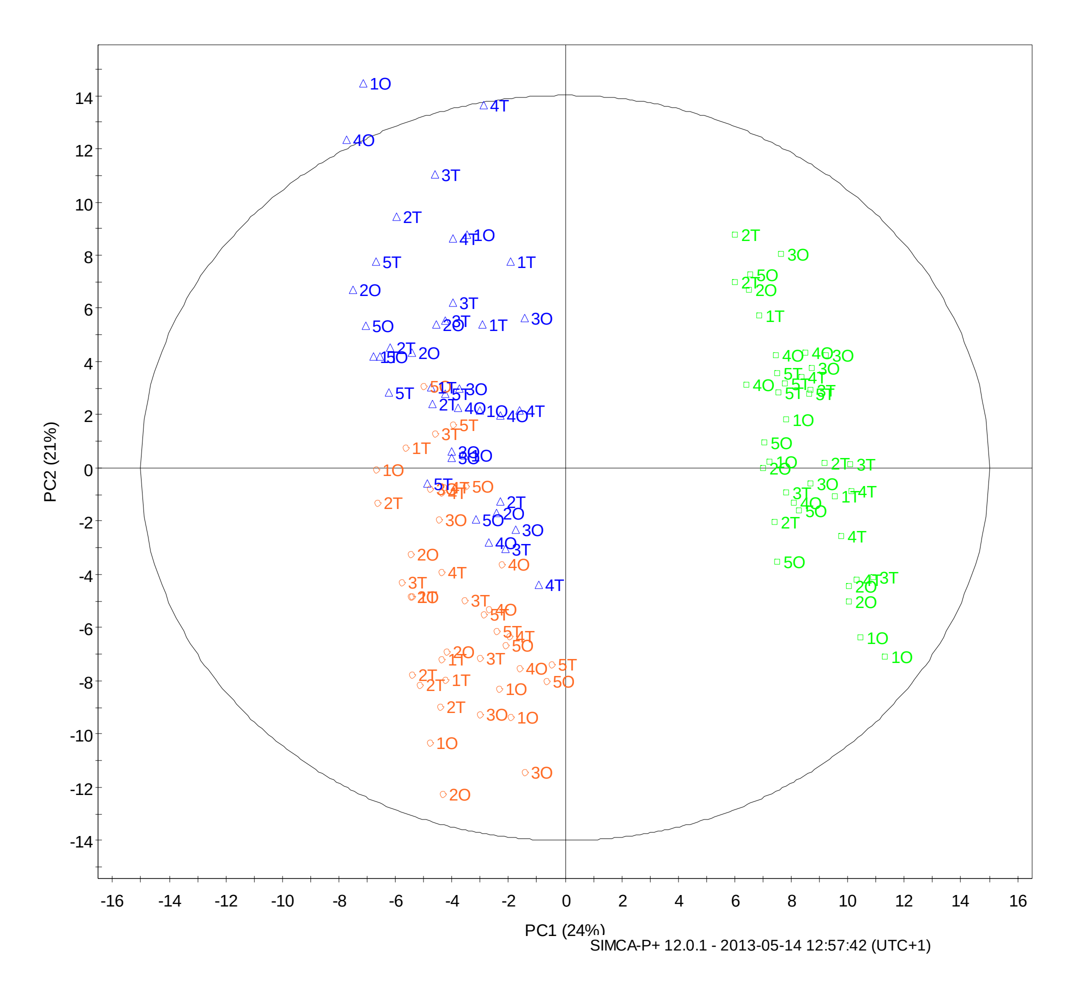


Figure 49: Analyse en composantes principales basée sur les concentrations des composés phénoliques chez 3 génotypes de peuplier euraméricain, Carpaccio en orange, Cima en vert et Robusta en bleu soumis ou non à un traitement ozone. Les échantillons sont représentés par le temps de prélèvement (1 à 5) suivi d'une lettre en fonction du traitement (Ozone : O et Témoin : T).

expliquent à elles trois 57% de la variance. La quatrième composante montre un effet ozone qui sur les trois génotypes dès la troisième date et expliquant 8% de la variance. Si nos analyses témoignent d'un effet de l'ozone sur les concentrations en composés phénoliques avec principalement une hausse des concentrations, cet effet reste mineur en face des différences constitutives entre génotypes. Ceci semble indiquer que si les composés phénoliques jouent un rôle dans les processus de détoxication, c'est surement leurs concentrations constitutives qui permettent de lutter plus ou moins efficacement face au stress oxydatif induit par l'ozone. L'identification des composés discriminant les profils de chaque génotype pourrait peut être révéler un facteur de tolérance à l'ozone.

3. CAPACITE DE REGENERATION DU NADPH DANS LES FEUILLES DE DEUX GENOTYPES DE PEUPLIER PRESENTANT DES DIFFERENCES DE SENSIBILITE A L'OZONE

Si la synthèse *de novo* est importante pour maintenir un pouvoir réducteur suffisant, elle doit être couplée avec de bonnes capacités de régénération des molécules oxydées. La régénération repose sur une suite de réactions d'oxydo-réduction qui se basent principalement sur la disponibilité en NADPH. Or, la capacité de régénération du NADPH est fortement dépendante de réactions enzymatiques liées au métabolisme carboné. L'assimilation de carbone est réalisée par l'intermédiaire des enzymes carboxylantes, Rubisco et PEPC. En réponse à l'ozone, la photosynthèse est limitée, provoquant un déficit énergétique et une diminution de l'assimilation de carbone.

Afin de déterminer ce qui provoque la baisse de l'assimilation de carbone, le contenu en chlorophylle et les activités des enzymes carboxylantes ont été mesurés. De plus, cette étude s'intéresse à l'effet de l'ozone sur le contenu en NADPH, ainsi que sur l'activité des enzymes recyclant le NADP. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Dr Dghim dans le cadre de sa thèse. Toutes les analyses d'activité ont été réalisées par Dr Dghim, ma participation consistant principalement dans les mesures de chlorophylles, d'échanges gazeux folaires et dans le calcul du POD. Le manuscrit issu de cette coopération met en avant les conclusions suivantes :

- l'ozone entraîne une baisse de l'assimilation nette de CO_2 qui résulte probablement d'une diminution du contenu en chlorophylle ainsi que d'un ralentissement de l'activité de la Rubisco.
- l'ozone provoque en revanche une augmentation de l'activité de la PEPC, probablement liée à une fonction anaplérotique pour soutenir la production d'intermédiaire du cycle de Krebs.
- l'ozone induit une hausse des activités des enzymes régénérant le NADPH, et ce de manière plus prononcée chez le génotype résistant (Carpaccio).

- la disponibilité en NADPH est maintenue chez le génotype résistant, tandis qu'elle chute chez le génotype sensible en réponse à l'ozone.

Ces résultats ont été publiés dans Physiologia Plantarum (2013) 148 : 36-50.

Physiologia Plantarum

An International Journal for Plant Biology

Physiologia Plantarum 148: 36–50. 2013

Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone sensitivity

Ata Allah Dghim[a,b,c], Jennifer Dumont[a,b,c], Marie-Paule Hasenfratz-Sauder[a,b,c], Pierre Dizengremel[a,b,c], Didier Le Thiec[a,b,c] and Yves Jolivet[a,b,c,*]

[a]UMR1137 EEF, Université de Lorraine, F-54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France
[b]UMR1137 EEF, INRA, F-54280, Champenoux, France
[c]IFR110 EFABA, F-54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

Correspondence
*Corresponding author,
e-mail: jolivet@scbiol.uhp-nancy.fr

Received 13 June 2012

doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01686.x

Cell capacity for cytosolic NADPH regeneration by NADP-dehydrogenases was investigated in the leaves of two hybrid poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) genotypes in response to ozone (O_3) treatment (120 ppb for 17 days). Two genotypes with differential O_3 sensitivity were selected, based on visual symptoms and fallen leaves: *Robusta* (sensitive) and *Carpaccio* (tolerant). The estimated O_3 flux (POD_0), that entered the leaves, was similar for the two genotypes throughout the treatment. In response to that foliar O_3 flux, CO_2 assimilation was inhibited to the same extent for the two genotypes, which could be explained by a decrease in Rubisco (EC 4.1.1.39) activity. Conversely, an increase in PEPC (EC 4.1.1.31) activity was observed, together with the activation of certain cytosolic NADP-dehydrogenases above their constitutive level, i.e. NADP-G6PDH (EC 1.1.1.49), NADP-ME (malic enzyme) (EC 1.1.1.40) and NADP-ICDH (NADP-isocitrate dehydrogenase) (EC1.1.1.42). However, the activity of non-phosphorylating NADP-GAPDH (EC 1.2.1.9) remained unchanged. From the 11th fumigation day, NADP-G6PDH and NADP-ME profiles made it possible to differentiate between the two genotypes, with a higher activity in Carpaccio than in Robusta. At the same time, Carpaccio was able to maintain high levels of NADPH in the cells, while NADPH levels decreased in Robusta O_3-treated leaves. All these results support the hypothesis that the capacity for cells to regenerate the reducing power, especially the cytosolic NADPH pool, contributes to improve tolerance to high ozone exposure.

Introduction

Ozone (O_3) is a harmful phytotoxic stressor for plants (Fuhrer et al. 1997, Matyssek and Innes 1999, Ashmore 2005, Karnosky et al. 2007, Wittig et al. 2009). It causes serious damage, including visible injury and growth decline that can lead sensitive species to death. In trees, its harmful effect can vary with growth conditions, age, structure or the presence of other stressors (Vollenweider et al. 2003, Matyssek et al. 2004, Karnosky et al. 2005, UNECE 2005, McLaughlin et al. 2007). Poplar has been demonstrated to be among the most sensitive tree species, but its sensitivity varies depending on clones/genotypes (Karnosky et al. 1996, Yun and

Abbreviations – Chl, Chlorophyll; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ICDH, NADP-isocitrate dehydrogenase; ME, malic enzyme; ML, mature leaves; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; POD, phytotoxic ozone dose; ROS, reactive oxygen species; Rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase.

Laurence 1999, Bortier et al. 2000, Di Baccio et al. 2008, Renaut et al. 2009, Street et al. 2011). To predict the detrimental effect of O_3 on plants, several indicators of critical levels have been proposed in the last 25 years. First, SUM06 (sum of all hourly average concentrations over 0.06 ppm) or AOT40 (sum of hourly O_3 concentrations above a threshold of 40 ppb O_3 during daylight hours of the growing season) were universally used (Gothenburg Protocol 1999). However, these indicators were based on atmospheric O_3 concentration, and they were left aside in favor of flux-based indices such as POD_Y (Phytotoxic Ozone Dose above a threshold of Y nmol m^{-2} s^{-1}). This new index takes into account the real O_3 flux entering the leaf through stomata (Gerosa et al. 2009), and it is based on an empirical modeling of stomatal conductance (UNECE 2004). In this concept, the threshold takes into account the intrinsic detoxifying ability of the species in question, which still remains poorly known (Baumgarten et al. 2009). As recently described, two main O_3-detoxifying barriers should be considered, and are highly variable depending on species/genotype (Dizengremel et al. 2008). The first line of defense is apoplastic ascorbate (Smirnoff 1996, Plöchl et al. 2000). When that barrier is overridden by O_3 or its ROS derivatives, a second cytosolic line of defense is available within the cell. Ascorbate, glutathione, flavonoids and phenolic compounds are the main actors of the second detoxifying barrier, together with a set of ROS-scavenging enzymes (Castagna and Ranieri 2009). Symplastic ascorbate is regenerated by several cytosolic detoxifying reactions that are mainly connected to the Halliwell–Asada–Foyer cycle (Foyer and Noctor 2011), which highly depends on the presence of cytosolic NADPH (Fig. 1). Thus, its regeneration in the cytosol could be considered as a key factor for cells to face O_3-generated oxidative stress (Noctor 2006, Dizengremel et al. 2009).

The capacity for cytosolic NADPH regeneration tightly depends on enzymatic reactions linked to carbon metabolism. In fact, O_3 exposure goes along with a reduction of the Calvin cycle turn-over, starting with a decrease in Rubisco activity (Pell et al. 1992, Dizengremel 2001, Bagard et al. 2008, Dizengremel et al. 2009). A simultaneous increase in PEPC activity has been observed in several C_3 plants (Landolt et al. 1997, Dizengremel 2001, Dizengremel et al. 2009). PEPC stimulation is linked to the anaplerotic replenishment of citrate cycle intermediates, but also to higher activity of two NADPH-dependent cytosolic enzymes: NADP-malic enzyme (NADP-ME) and NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) (Fig. 1). NADP-ME catalyzes the reversible oxidative decarboxylation of L-malate into pyruvate which leads to the release of NADPH in the cytosol (Fig. 1). An increase in its activity has been linked to plant metabolic responses to various biotic and abiotic stresses (see Doubnerová and Ryslavá 2011 for a review) and, interestingly, to chronic and acute O_3 fumigation (Fontaine et al. 1999, Dizengremel et al. 2009, Guidi et al. 2009). NADP-ICDH catalyzes the formation of 2-oxoglutarate from isocitrate, using $NADP^+$ as a cofactor. It delivers NADPH directly into the cytosol (Fig. 1). Higher NADP-ICDH activity has been linked to plant responses to oxidative stress (Møller and Rasmusson 1998, Hodges et al. 2003). NADPH produced by NADP-ICDH contributes to redox homeostasis not only in response to abiotic stress (Dizengremel 2001, Smeets et al. 2005), but also in the case of pathogen attacks (Mhamdi et al. 2010). The increase in NADP-ICDH activity can also be part of reactions involving amino acid replenishment for cell maintenance or repair processes (Dizengremel et al. 2009).

Cytosolic NADPH can also be produced by other NADP-recycling enzymes such as glucose-6-phosphate dehydrogenase (NADP-G6PDH) and non-phosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP-GAPDH) (Fig. 1). Plant NADP-G6PDH has mostly been studied for its role as an important NADPH source in fat-producing and non-photosynthetic tissues (Emes and Neuhaus 1997, Wakao et al. 2008). An increase in its activity has been measured in plants submitted to various biotic and abiotic stresses (Batz et al. 1998, Nemoto and Sasakuma 2000, Valderrama et al. 2006) particularly in response to O_3 fumigation (Dizengremel 2001, Fontaine et al. 1999, Gaucher et al. 2003). The regulation of non-phosphorylating NADP-GAPDH activity is not so well-known, but its implication in oxidative stress responses has been established (Bustos et al. 2008). Finally, when studied individually, most of these NADP-dependent enzymes were found implied in cells' capacity to increase the supply of cytosolic NADPH in response to oxidative stress. However, an integrated study to estimate the relative importance of each enzyme has not been carried out yet, especially in response to high daily O_3 doses.

The main objective of our work was to study the reducing power (NADPH) regeneration capacity of poplar leaves under ozone treatment. On the basis of the visible damage, two poplar genotypes were selected: *Robusta* (defined as O_3-sensitive) and *Carpaccio* (defined as O_3-tolerant). When we exposed the two genotypes to a high dose of 120 ppb O_3 for 17 days, they displayed similar O_3 influxes into leaves (based on POD values). So the differences in O_3 sensitivity could be attributed to a differential plasticity in leaf biochemical response. In this context, we compared the effects of O_3 treatment

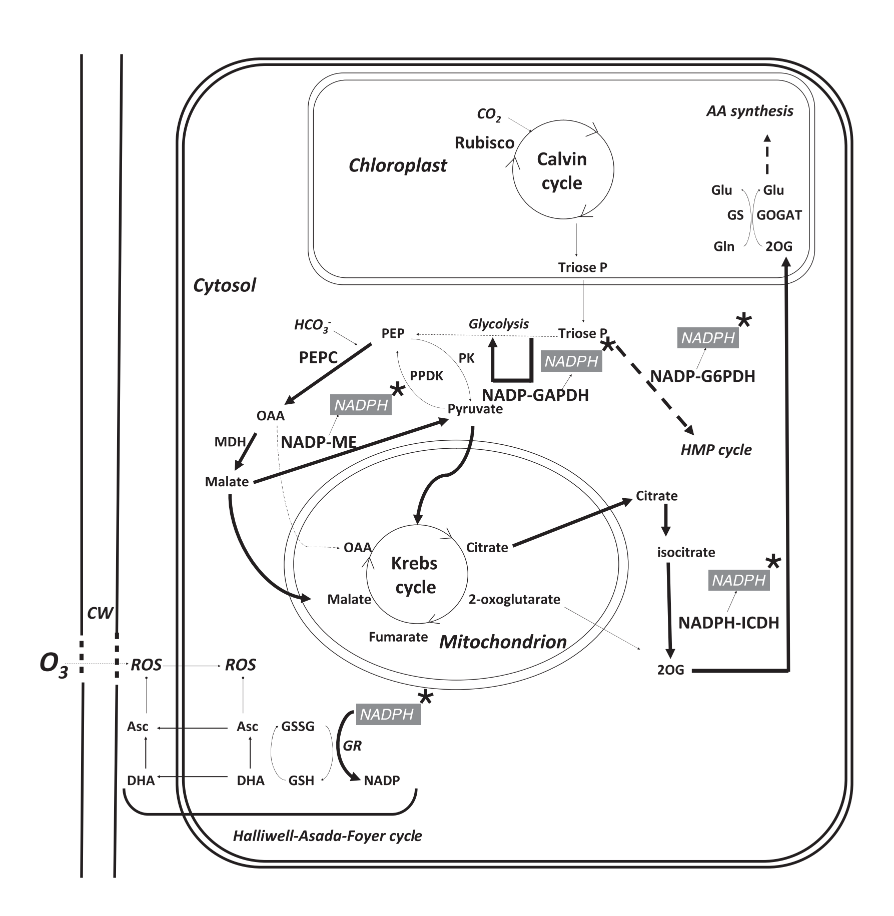


Fig. 1. Simplified scheme showing the NADP-dependent enzymes associated with cytosolic NADPH production and its use for detoxification reactions (Halliwell Asada Foyer cycle). NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) activity is linked to oxoglutarate (2-OG) production in the cytosol, which is then imported into plastids to generate glutamate and other amino acids (AA). NADP-glucose-6-phosphate dehydrogenase (NADP-G6PDH) activity is linked to the functioning of the hexose monophosphate pathway (HMP). The substrate of the NADP-malic enzyme (NADP-ME) is malate, which can be the product of the successive reactions catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and cytosolic malate dehydrogenase (MDH). Phosphoenolpyruvate (PEP) and oxaloacetate (OAA) are respectively the substrates for these latter enzymatic reactions. NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP-GAPDH) is considered as a shunt in the glycolytic pathway which bypasses the production of NADH and ATP. Pyruvate kinase (PK) catalyzes the last step of the glycolytic pathway to produce pyruvate. Asc, ascorbate; CW, cell wall; DHA, dehydroascorbate; GSH/GSSG, reduced/oxidized glutathione; GR, glutathione reductase; PPDK, pyruvate phosphate dikinase. (*) refers to the NADPH produced by cytosolic NADP-dehydrogenases.

(1) on carbon uptake by assessing net CO_2 assimilation and carboxylase activities (Rubisco and PEPC), (2) on cytosolic NADP-recycling enzymatic activities related to PEPC activity and (3) on pyridine nucleotide contents, by associating their variations to the activity levels of the NADP-dependent enzymes we assayed.

Material and methods

Growth and experimental design

Rooted cuttings of two Euramerican hybrid poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) genotypes, *Robusta* and *Carpaccio*, were transplanted to 5-l plastic pots containing optimized growth soil mixture (N/P/K 14/16/18, 1.2 kg m^{-3}, Gramoflor SP1 Universel) fertilized by adding 20 g of slow-release nutrient granules (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France). Drainage was improved by a 2-cm thick layer of clay balls at the bottom of the pots and 1 mg l^{-1} of magnesium limestone was added to buffer the pH. The plants were left in growth chambers for 5 weeks. Temperature was maintained at 23°C ± 1°C (day) and 20°C ± 1°C (night) with a relative humidity of 75% ± 5% (day) and 85% (night) and with a 14-h light period (Sun T Agro, Philips, Eindhoven, The Netherlands; 250–300 μmol m^{-2} s^{-1} photon flux at leaf height). The plants were irrigated daily using tap water. During the growth period, one terminal shoot was kept. When the trees were approximately 60 cm high, selected uniform plants were transferred into phytotronic chambers for ozone exposure. In order to obtain a

statistically relevant biological replicate, 40 individuals of each genotype were distributed in eight chambers, half of which (four chambers) were set for O_3 treatment.

Fumigation and cumulative ozone uptake calculation

Phytotronic chambers were constantly ventilated with charcoal-filtered air, and growth conditions were maintained identical to those in the growth chamber with 400 μmol m^{-2} s^{-1} photon flux (floor level). O_3 treatment started at the end of a 7-day long acclimation period. O_3 was produced from pure O_2 with two ozone generators (OZ500; Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and injected directly along with the filtered air entering the chambers. Control trees were exposed to ambient O_3 concentrations (<4 ppb) throughout the treatment period. A set of automated systems and analyzers (O341M; Environment S.A., Paris, France) were used to monitor the concentrations and the length of O_3 exposure. The plants were exposed to 120 ppb $\pm$ 10 of O_3 for 13 h (09:00 to 22:00 h) daily for 17 days. Fumigation started 1 h after the beginning of the photoperiod and ran until its end. The plants were scattered and spaced daily to avoid shading. The ozone flux was estimated based on the measurement of stomatal conductance to ozone (g_{O3}), which is related to stomatal conductance to water vapor (g_s) by the following formula: $g_{O3} = 0.668\ g_s$ (Fares et al. 2008). g_s Measurements were performed every 2 days. For days when no measurement was performed, g_{O3} was estimated from the adjacent values (Bagard et al. 2008). POD_0 (mmol m^{-2}) was estimated by summing up hourly ozone uptakes throughout the whole experiment. In this context, our data provide indicative POD_0 estimates.

Measurement of gas exchange parameters and of total chlorophyll contents

Net CO_2 assimilation (*A*, μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) and stomatal conductance to water vapor (g_s, mol H_2O m^{-2} s^{-1}) were measured using two intercalibrated portable photosynthesis Systems LI-COR 6200 (LI-COR® Inc, Lincoln, NE, USA). Measurements were only performed on the last fully expanded mature leaves (ML), corresponding to the 8th–10th leaves down from the first apical leaf. Three trees per genotype per chamber were kept from destructive sampling and only used for gas exchange. Relative chlorophyll contents (in CCI unit) were estimated using a CCM-200 (Chlorophyll Content Meter, Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Total Chl per leaf area (g m^{-2}) was determined using a known relationship established for tree leaves (Chl = 0.0214 CCI unit) as mentioned in Bagard et al. (2008). Measurements began on day 4 after fumigation started and stopped the day after fumigation ended (day 18).

Sampling procedure

Samples were taken on ML along the 17-day long exposure, on days 2, 4, 7, 11 and 17 after the beginning of fumigation. Two leaves, located next to each other, were sampled *per* tree and *per* chamber. Midribs and petioles were cut off from the foliar limb using a razor blade. Leaf samples were collected in aluminum paper, rapidly frozen in liquid nitrogen and immediately stored at −80°C.

Protein extraction and quantification

A leaf powder extract (300 mg) and 10% (w/w) polyvinylpolypyrrolidone were mixed with 3.5 ml of extraction buffer containing HEPES–KOH pH 7.5 (100 m*M*), PVP 25 6% (m/m), PEG 20 7% (m/m), $MgCl_2$ 5 m*M*, EGTA 5 m*M*, glycerol 10% (v/v) and 5% (v/v) protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich P9599). The crude extracts were then centrifuged at 36 000 *g* and at 4°C. The supernatants were filtered through Sephadex G25 columns (Pharmacia PD-10, Orsay, France) according to the manufacturer's instructions. The elution buffer contained HEPES–KOH pH 7.5, glycerol 10% (v/v), $MgCl_2$ 5 m*M* and DTT 2 m*M*. The eluted volume was homogenized and stored at −80°C for further analysis.

Total soluble proteins were determined according to Wildhagen et al. (2010), a protocol adapted for microplate spectrophotometry. Ten-microliter duplicates of protein extracts were pipetted into the wells of a 96-well plate and mixed with the protein assay dye (Bio-rad Laboratories, Inc., Munich, Germany). Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was used as a calibration standard.

Enzymatic activity assays

All enzymatic activities were assayed using a microplate spectrophotometer (Biotek, PowerWave™ HT, USA). Four different leaf extracts from either control or O_3-treated trees were used for each sampling date. Activities in each extract were measured in duplicates at 30°C. Only linear segments were used to calculate the maximum rates of the enzymatic reactions. Rubisco (EC 4.1.1.39) activity was determined by monitoring NADH extinction at 340 nm according to the protocol described by Fontaine et al. (1999). The reaction mixture was made of Bicine pH 8.0 (100 m*M*), $NaHCO_3$ 25 m*M*, NADH 0.3 m*M*, $MgCl_2$

20 m*M*, phosphocreatine 5 m*M*, ATP 5 m*M*, glyceraldehyde 3-phosphodehydrogenase (G3PDH, EC 1.2.1.12) 10 units ml^{-1}, 3-phosphoglycerate kinase (3 PGK, EC 2.7.2.3) 10 units ml^{-1} and creatine phosphokinase (CPK, EC 2.7.3.2) 5 units ml^{-1}. The reaction was started by adding 1 m*M* ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP). A control without RuBP was prepared for each assay. The PEPC (EC 4.1.1.31) assay followed the same principle, as in Fukayama et al. (2003). The assay medium contained Tris–HCl pH 8.0 (100 m*M*), $NaHCO_3$ 5 m*M*, NADH 0.3 m*M*, $MgCl_2$ 20 m*M*, glucose 6-phosphate 2 m*M*, malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) 15 units ml^{-1}. The reaction was initiated by adding PEP 4 m*M*. A control without PEP was prepared for each assay. All the protocols used to measure cytosolic NADP-dependent enzymatic activities were based on NADPH formation at 340 nm. NADP-G6PDH (EC 1.1.1.49) activity was determined following Pitel and Cheliak (1986), who used a 50-m*M* HEPES buffer pH 7.6. The pH value was optimized for assaying the activity of the cytosolic isoform (the optimal pH for the chloroplastic isoform is 8.5). NADP-ME activity (EC 1.1.1.40) was determined according to Casati et al. (1997). NADP-ICDH (EC 1.1.1.42) activity was measured according to Gupta and Singh (1988). Cytosolic NADP-GAPDH (EC 1.2.1.13) activity was assayed following Bustos and Iglesias (2003).

Pyridine pool determination

The determination of NAD(H) and NADP(H) contents was based on the reduction of dichlorophenolindophenol by phenazine methosulfate, enzymatically coupled with alcohol dehydrogenase and NADP-G6PDH, respectively. According to the protocol described by Queval and Noctor (2007), slightly modified, 100 mg of leaf powder was homogenized (2 min with 2 tungsten balls, using a Retsch MM301 mixer) with 1 ml of HCl 2N (NAD^+, $NADP^+$) or 1 ml of NaOH 0.2*M* (NADH, NADPH). The mixture was centrifuged at 16 000 *g* for 10 min and the supernatant was neutralized. Absorbance-reading at 600 nm was initiated after adding 10 µl of the appropriate enzyme, in the presence of 20 µl of the assay extract and using a microplate spectrophotometer (Biotek, PowerWave™ HT, USA). Maximum rates were calculated automatically by the plate reader software and then processed using Microsoft Excel.

Statistical analysis

The data in this article are presented as means ± SE. At each sampling date, we performed a 'TYPE III' two-way analysis of variance (ANOVA), using R (R Development Core Team, 2011), with genotype and treatment as variable factors. The data were rearranged into a linear model and differences between control and O_3 samples were considered significant if $P < 0.05$. To compare the inter-group means, the ANOVA test was followed by a significant ($P < 0.05$) Tukey range test. Linear regression was used to test the correlations between different enzymatic activity data, and was followed by a two-way ANOVA to compare r^2. Using a linear logarithmic model in R, no statistically significant chamber effect was found for any of the tested parameters throughout the whole fumigation period.

Results

Visible injury and leaf fall

The ozone fluxes cumulated via plant stomata in the absence of a threshold value (POD_0) were calculated for *Carpaccio* and *Robusta*. They were averaged using the values obtained in the four O_3 phytotronic chambers. Throughout the whole fumigation period, we observed a continuous increase in POD_0 which differed little between the two genotypes (Fig. 2). Even though ozone flux levels were similar, the two genotypes showed differences in the occurrence and the aspect of leaf injuries due to O_3 treatment (120 ppb). For *Robusta*, damage rapidly spread onto the first fully expanded leaves located at the bottom of the trees, and resulted in severe, large mottle necrosis on large surfaces (Fig. 3D). The last fully expanded leaves (ML) of this genotype displayed the same type of injury, but to a lesser extent (Fig. 3B), with brown flecks near the edges in some cases. For *Carpaccio*, the first symptoms also occurred on the first fully expanded leaves and started with chlorotic flecks on the total leaf areas, resulting in moderate internal brownish stippling (Fig. 3C). At the end of the O_3 treatment, some ML also exhibited rare, small, brown stippling on their upper surface (Fig. 3A). Due to O_3

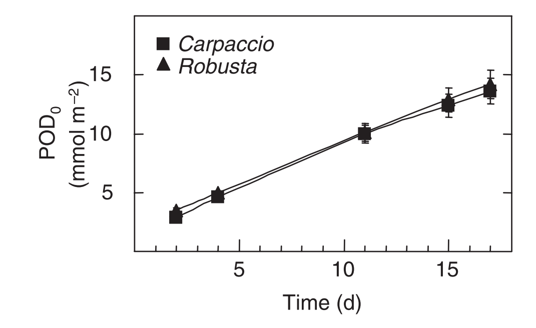


Fig. 2. Time course of POD_0 values during O_3 fumigation in *Carpaccio* and *Robusta* genotypes. Values represent means of n = 20 ± SE, and represent the average POD_0 values obtained in four O_3 chambers.

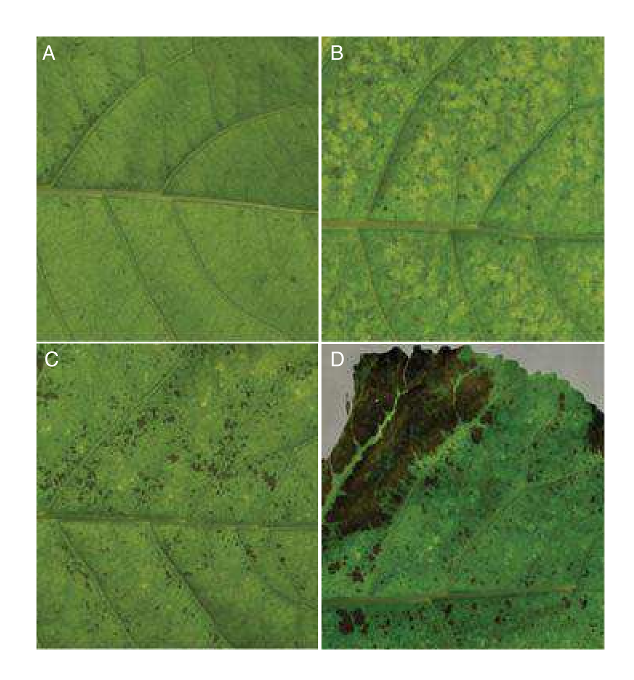


Fig. 3. Comparison of ozone-induced leaf injury observed on the last fully-expanded leaves (A, B) and the first fully expanded leaves (C, D) of *Carpaccio* (A, C) and *Robusta* (B, D) genotypes. Both genotypes were exposed to a dose of 120 ppb O_3 for 17 days.

Table 1. Percentages of fallen leaves during ozone treatment, calculated in relation to total numbers of *Carpaccio* (C) and *Robusta* (R) leaves. Values n = 4 ± SE (Significant differences between O_3-exposed and control extracts are indicated by *** ($P < 0.001$).

Day	C-O_3	R-O_3
2	0	0
4	0	0
11	8.5 ± 4.2***	20.9 ± 0.8***
15	20.3 ± 8.6***	36.6 ± 3.9***
17	27.2 ± 6.3***	37.3 ± 4.1***

exposure, severe, significant leaf abscission occurred in the two genotypes (Table 1). Leaf fall was located at the lower parts of the stems and went on toward the top. Leaf fall was more severe in *Robusta* than in *Carpaccio*, and its rate increased earlier (Table 1). At the end of the O_3 treatment, leaf abscission tended to stabilize for *Robusta* (36 to 37%), while it was still increasing for *Carpaccio* (27%). Overall, careful observation of leaf injuries and monitoring of leaf abscission strengthened our general visual conclusion of a higher O_3 sensitivity of the *Robusta* genotype.

Net CO_2 assimilation and total chlorophyll contents

The two genotypes displayed comparable rates of CO_2 assimilation in control conditions (Fig. 4A, B). In response to O_3 treatment, CO_2 assimilation by the two genotypes gradually decreased (Fig. 4A, B). The decrease in CO_2 assimilation in response to ozone was significant ($P < 0.05$) for the two genotypes at the end of O_3 exposure (days 15 and 17). However, no significant difference was detected between the two genotypes (Table 2). In control conditions, the Chl content of ML increased during the experimental period, with higher values for *Robusta* compared to *Carpaccio* (Fig. 4C, D). Ozone treatment reduced the total Chl content of the two genotypes. The decrease became significant on day 11 of the treatment for *Robusta* (Fig. 4D) and on day 15 for *Carpaccio* (Fig. 4C). Genotype effect between the O_3-treated trees was only significant on day 11 (Table 2). At the end of the O_3 treatment, *Carpaccio* retained only 45% of its total Chl content and *Robusta* 50%.

Carboxylase activities

In response to O_3 fumigation, we measured a significant increase in PEPC activity in the leaves of the two poplar genotypes (Fig. 5A, B). However, the curves were slightly different for the two genotypes. The differences between control and O_3-treated leaves became highly significant from day 4 ($P < 0.01$) for *Robusta*, but only from day 11 for *Carpaccio* ($P < 0.001$; Fig. 5A, B). Maximum PEPC activity values were recorded on day 15 after the beginning of fumigation for the two genotypes. Moreover, on days 15 and 17, the activity levels in O_3-treated leaves were slightly higher and statistically significant for *Robusta* compared to *Carpaccio* (Table 2). Conversely to PEPC activity, Rubisco activity gradually decreased in ozone-treated leaves (Fig. 5C, D). That decrease was significant from day 11 of the O_3 treatment for the two genotypes (Fig. 5C, D). Rubisco activity inhibition reached a maximum on day 17 (30% and 37% for *Carpaccio* and *Robusta*, respectively). The differences between the two genotypes in O_3-treated leaves were not significant (Table 2).

NADP-dependent enzymatic activities: NADP-ME, NADP-ICDH, NADP-G6PDH and NADP-GAPDH

We hypothesized that the results presented in this section were predominantly related to the activity of cytosolic NADP-dehydrogenases. Such a hypothesis could be justified by several works on *Arabidopsis thaliana*, which show that cytosolic isoform mutants lose most of the total activity in crude leaf extracts (Wakao et al. 2008, Mhamdi et al. 2010, Voll et al. 2012). Concerning NADP-GAPDH, no significant change occurred in response to O_3 treatment in either genotype (Fig. 6A, B). In contrast, NADP-G6PDH activity clearly increased

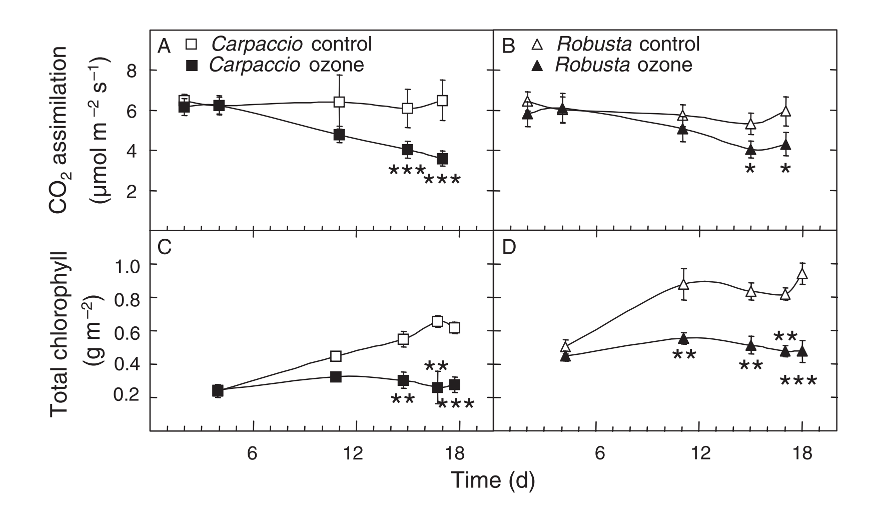


Fig. 4. Effect of O_3 treatment on CO_2 assimilation (A, B) (n = 6 ± SE) and on total chlorophyll contents (C, D) (n = 20 ± SE) respectively in O_3-treated and control ML leaves of *Carpaccio* (A, C) and *Robusta* (B, D) genotypes. Type III ANOVA tests performed with R stat 2011, considering O_3-treatment and genotypes as variability factors. Significant differences between O_3-treated and control leaves are indicated by * ($P < 0.05$),** ($P < 0.01$) and ***($P < 0.001$).

Table 2. Determination of genotype-dependent responses to O_3 using *t*-test. The test used the means of PEPC and Rubisco activity levels, net CO_2 assimilation rates (*A*), Chl contents, NADP-dependent dehydrogenase activity and pyridine nucleotide pools of control and O_3-treated *Carpaccio* (C-O_3) and *Robusta* (R-O_3). At all sampling dates for all the tested parameters (data not shown in the Table), *Carpaccio* and *Robusta* control means displayed no statistical difference at the 5% probability level. *P* values are given when *Carpaccio* (C-O_3) values were significantly higher (+) or lower (−) than *Robusta* (R-O_3) values at the 5% probability level. 'ne': no genotype effect.

	Genotypes	Day 2 *P* value	Day 4 *P* value	Day 11 *P* value	Day 15 *P* value	Day 17 *P* value	Day 18 *P* value
A	C-O_3 R-O_3	ne	ne	ne	ne	ne	
Chl	C-O_3 R-O_3	ne	ne	− 0.023	ne	ne	ne
PEPC	C-O_3 R-O_3	ne	ne	ne	− 0.005	− 0.002	
Rubisco	C-O_3 R-O_3	ne	ne	ne	ne	ne	
NADP-G6PDH	C-O_3 R-O_3	ne	ne	+ <0.001	+ 0.016	ne	
NADP-ME	C-O_3 R-O_3	ne	ne	+ <0.001	+ 0.05	+ 0.006	
NADP-ICDH	C-O_3 R-O_3	ne	ne	ne	− 0.028	ne	
NADPH	C-O_3 R-O_3	ne	ne	+ 0.026	+ 0.044	ne	
NADH	C-O_3 R-O_3	ne	ne	ne	ne	ne	
$NADP^+$	C-O_3 R-O_3	ne	ne	ne	ne	ne	
NAD^+	C-O_3 R-O_3	ne	ne	ne	ne	ne	

in ozone-exposed leaves, but the sequence of events of the stimulation process slightly differed between the two genotypes (Fig. 6C, D). In *Robusta*, NADP-G6PDH activity constantly increased and reached a maximum at the end of the fumigation period (day 17, Fig. 6D). In *Carpaccio*, the activity reached a maximum on day 11 of the treatment (Fig. 6C). On days 11 and 15, a significant genotype effect was detected for O_3-treated trees with higher activity values for *Carpaccio* (Table 2). NADP-ME activity increased under O_3 treatment and reached

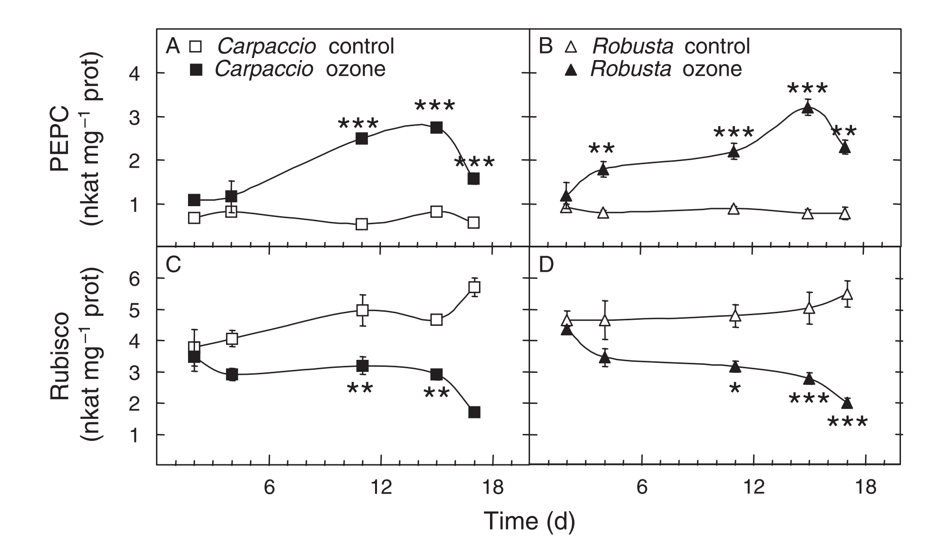


Fig. 5. Effect of O_3 treatment on PEPC activity (A, B) and on Rubisco (C, D) activity (nkat mg^{-1} protein) in leaf protein extracts of *Carpaccio* (A, C) and *Robusta* (B, D) genotypes (n = 4 ± SE). Significant differences between the O_3-treated and control leaf extracts are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) and *** ($P < 0.001$).

a maximum value on day 15 for the two genotypes (Fig. 6E, F). For this enzyme, a genotype effect was observed for O_3-treated trees on days 11, 15 and 17, with higher activity values for *Carpaccio* (Table 2). Similar to NADP-ME and NADP-G6PDH, NADP-ICDH activity was stimulated in O_3-treated leaves of the two genotypes (Fig. 6G, H). The activity reached a peak on day 15 for the two genotypes. However, at that sampling date, NADP-ICDH activity was lower in *Carpaccio* (Table 2).

Regarding the relationship between NADP-dependent enzyme activities versus PEPC activity, an approximate linear correlation prevailed, except for NADP-GAPDH (Fig. 7A–D). The correlation for NADP-ICDH versus PEPC was high ($r^2 \geq 0.9$), and no difference between the two genotypes was found (Fig. 7D). On the other hand, the genotype-dependent linear relation differed for NADP-ME and NADP-G6PDH versus PEPC (*P* values of 0.0003 and 0.0076, respectively). For those two NADP-dependent enzymes, the slopes of the linear regression were steeper for *Carpaccio* (Fig. 7A, C) than for *Robusta*. A linear relation was also found between NADP-ICDH versus NADP-ME activity in the two genotypes (Fig. 7E), with a higher slope for *Carpaccio*. However, the positive slope of this linear relation was below 1, showing a higher increase of NADP-ME activity in O_3-treated leaves of the two genotypes as compared to ICDH activity.

Leaf pyridine contents

In control conditions, the contents in oxidized or reduced pyridine nucleotide forms did not change in the leaves of either poplar genotype (Fig. 8). However, changes were noticed in response to O_3 treatment. Concerning NADPH, its contents decreased in *Robusta* from the start of the O_3 treatment, with a significant difference on days 11 and 15 (Fig. 8B). The maximum decrease was reached on day 15 (60% of the control value). In contrast, no significant effect of O_3 treatment was noticed on NADPH contents for *Carpaccio* (Fig. 8A). Consequently, genotype effect in O_3-treated leaves (with higher values for *Carpaccio*) was significant on days 11 and 15 (Table 2). NADH contents (Fig. 8E, F) followed the same pattern as *Carpaccio* NADPH contents, without any difference between treatments (Fig. 8A, E). For *Robusta*, the lower NADH content in O_3-treated leaves was not significant (Fig. 8F). For NADH, no significant difference was found between the two genotypes all along the ozone treatment (Table 2). Concerning the oxidative forms of pyridine nucleotides, we observed a decrease in $NADP^+$ contents for *Carpaccio* (Fig. 8C). This decrease was significant on day 15 ($P < 0.05$). For *Robusta*, few changes occurred in the $NADP^+$ pool in response to O_3 fumigation. Moreover, NAD^+ curves showed similar patterns in the O_3-treated leaves from the two genotypes: nearly twice as high levels as in the control were found after 15 and 17 days' exposure for the two genotypes. Considering the changes in NAD^+ or $NADP^+$ contents in the O_3-treated leaves, no genotype effect was noticed (Table 2). Taking these results into account, we can consider that in response to O_3 exposure, the main changes in the pyridine nucleotide forms occurred at the end of the fumigation period. On day 15, $NADH/NAD^+$ ratios in O_3-treated leaves dropped by approximately

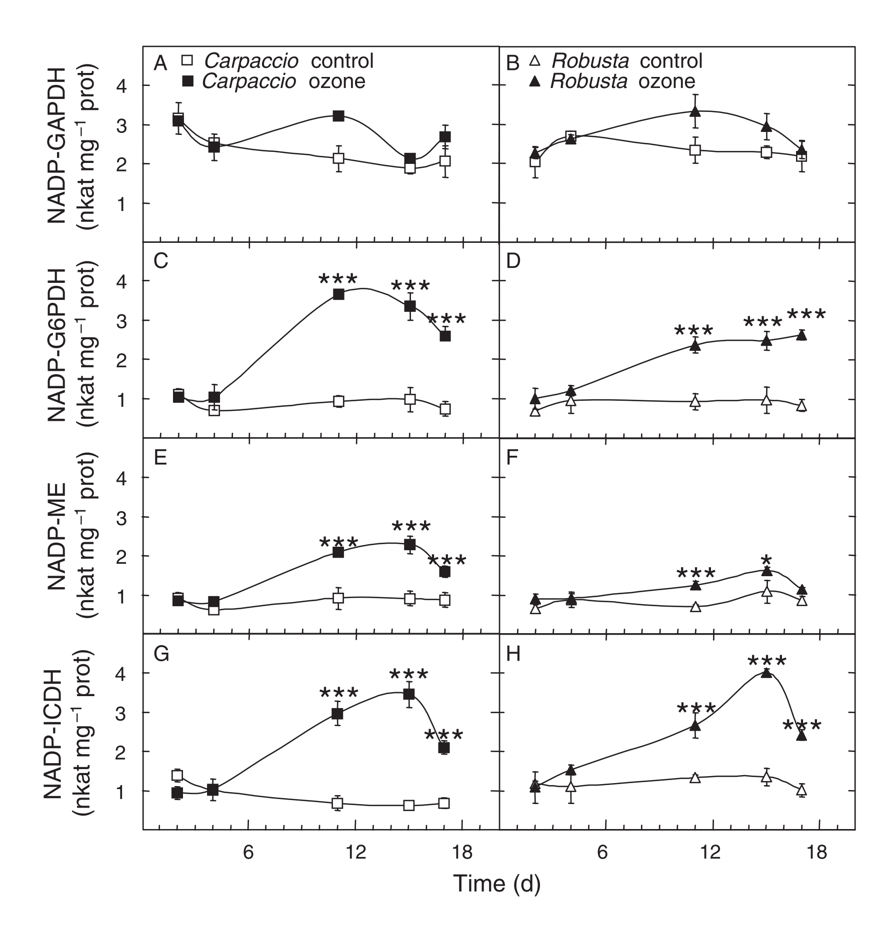


Fig. 6. Effect of O_3 treatment on NADP-GAPDH activity (A, B), on NADP-G6PDH activity (C, D), on NADP-ME activity (E, F) and on NADP-ICDH (G, H) activity (nkat mg^{-1} protein) in leaf-protein extracts of *Carpaccio* (A, C, E, G) and *Robusta* (B, D, F, H) genotypes ($n = 4 \pm$ SE). Significant differences between the O_3-treated and control leaf extracts are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) and *** ($P < 0.001$).

50–60% for the two genotypes with a concomitant increase of the NAD(H) pool (Table 3). For *Carpaccio*, the $NADPH/NADP^+$ ratio increased while it decreased by 50% for *Robusta*. On day 15, the NADP(H) pool tended to decrease for the two genotypes and the total amounts of all the pyridine nucleotide forms (reduced as well as oxidized) were fairly similar for either control or O_3 treatment for the two genotypes.

Discussion

In this study, high daily O_3 exposure (120 ppb) induced different responses on two poplar genotypes in terms of symptoms and acceleration of foliar senescence. We visualized different types of leaf injuries. They first appeared within a few days on *Robusta* and consisted in large mottle necrosis, first on ML and subsequently on younger leaves. For *Carpaccio*, O_3 necroses were mainly located on ML and consisted in brownish stippling. Acceleration of leaf abscission, another characteristic of O_3 sensitivity on aspen (Karnosky et al. 1996, Yun and Laurence 1999, Ribas et al. 2005, Häikiö et al. 2009), was also more noticeable on *Robusta* and started a few days after the beginning of O_3 fumigation. We interpreted all these visual features as different levels of sensitivity to O_3 and concluded that *Robusta* was more sensitive to O_3 than *Carpaccio*.

All along the O_3 treatment, no major difference in POD_0 was observed between the two genotypes. Considering this fact, the differential O_3 sensitivity of the two genotypes could be attributed to biochemical responses rather than to differential stomatal O_3 uptake. As already shown on different poplar species, a decrease in CO_2 assimilation is one of the effects of O_3 exposure (Reich 1983, Yun and Laurence 1999, Bortier et al. 2000, Bagard et al. 2008). In this study, the decrease in CO_2 assimilation occurred to the same extent for the two genotypes. The evolution of chlorophyll contents and of rubisco activity could partly account for the decrease in CO_2 assimilation capacity. For these two parameters, O_3 exposure had the same effect or nearly the same effect on the two genotypes depending on sampling times.

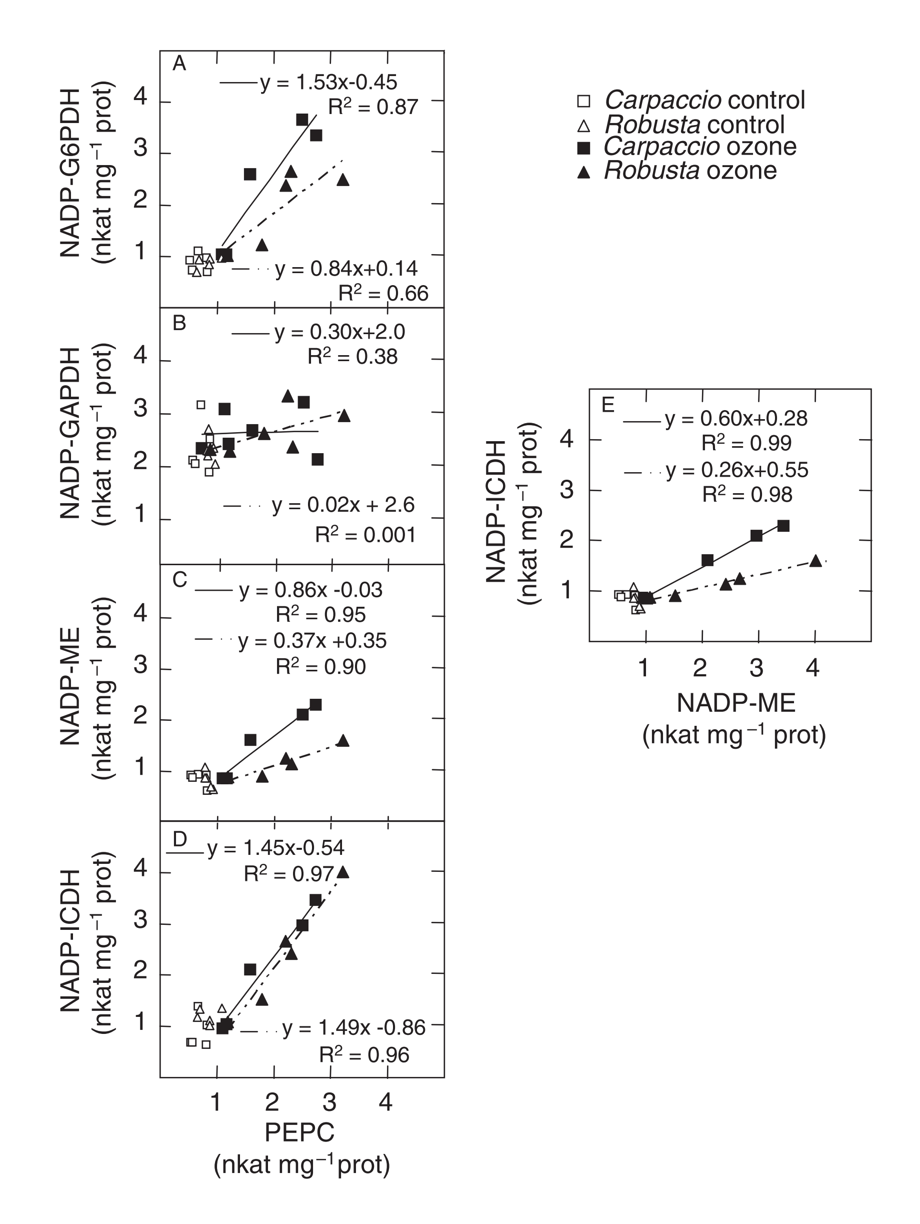


Fig. 7. Linear regression of NADP-G6PDH activity (A), NADP-GAPDH activity (B), NADP-ME activity (C) and NADP-ICDH (D) activity in relation to PEPC activity and NADP-ICDH activity versus NADP-ME activity (E) of *Carpaccio* and *Robusta* genotypes.

The reduction in Rubisco content and activity has been recorded in leaves of many species undergoing an oxidative stress and has been linked to several mechanisms such as (1) an increase in its proteolysis (Peñarrubia and Moreno 1990), (2) protein and/or mRNA synthesis inhibition (Brendley and Pell 1998, Pelloux et al. 2001, Bohler et al. 2007) and (3) protein fragmentation or structure modification due to ROS production (Ishida et al. 1997, Pell et al. 1999, Junqua et al. 2000, Abat et al. 2008). An increase in PEPC activity was distinctly observed for the two genotypes; that kind of O_3-induced effect has been previously mentioned for poplar trees (Landolt et al. 1997, Dizengremel 2001). PEPC activation, among other carbon metabolism changes, is believed to provide carbon intermediates used for repair processes (Dizengremel 2001). The increase in PEPC activity is generally linked to an increase in both the amounts of PEPC protein and transcripts (Dizengremel 2001, Fontaine et al. 2003, Matyssek et al. 2006). In our work, we showed that for the two genotypes, the increase in PEPC activity was quite well correlated to the increase in NADP-ICDH activity. This relation supports the hypothesis of an anapleurotic function of PEPC to fuel the Krebs cycle by providing precursors for amino acid synthesis, and of its contribution to cell maintenance in case of severe oxidative stress (Hodges et al. 2003).

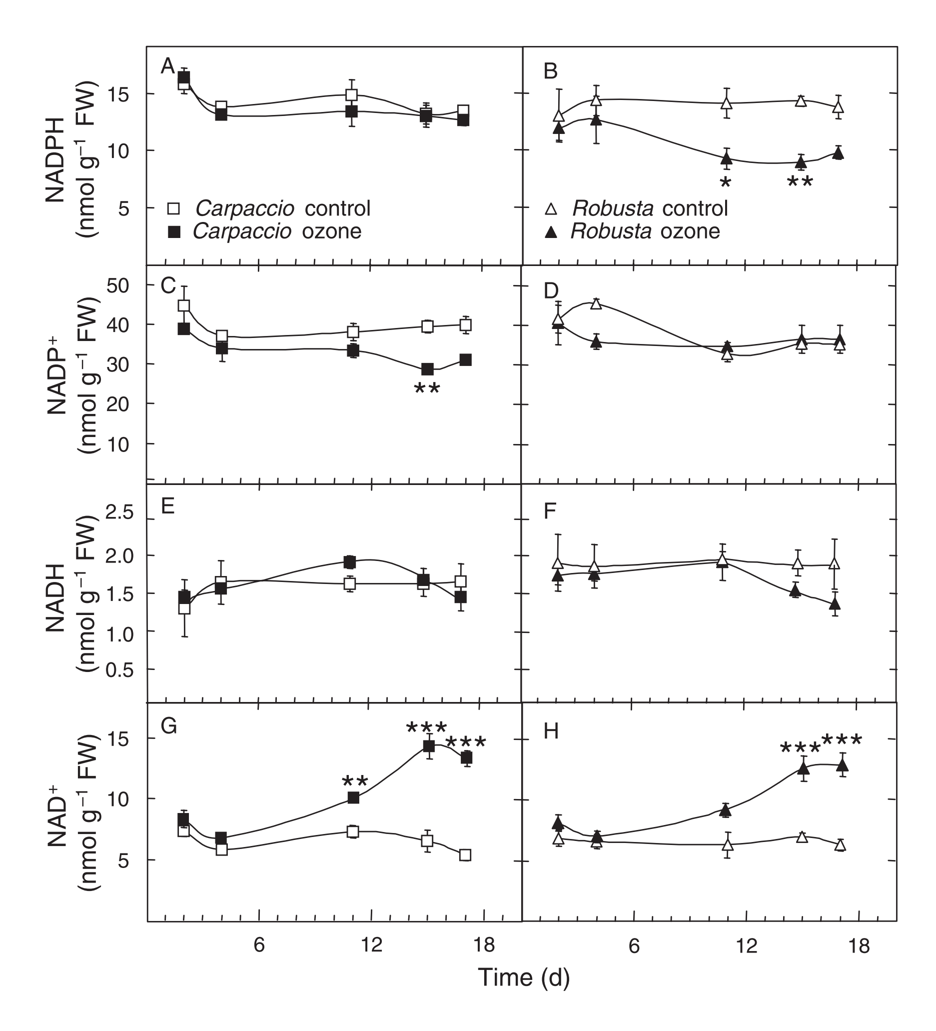


Fig. 8. Effect of O_3 treatment on NADPH (A, B), $NADP^+$ (C, D), NADH (E, F) and NAD^+ (G, H) contents (nmol g^{-1} FW) in leaf-protein extracts of *Carpaccio* (A, C, E, G) and *Robusta* (B, D, F, H) genotypes (n = 4 ± SE). Significant differences between the O_3-exposed and control extracts are indicated by * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) and *** ($P < 0.001$).

Table 3. NAD(P)H/NAD(P) ratios and total NAD(P)(H) (nmol g^{-1} FW) pools in the leaves of control (C) and 15-day ozone-treated (O_3) *Carpaccio* and *Robusta* genotypes.

	C-C	C-O_3	R-C	R-O_3
NADH/NAD^+	0.22	0.11	0.26	0.11
NADPH/$NADP^+$	0.33	0.49	0.36	0.26
$\sum$ NAD(H)(nmol g^{-1} FW)	8.0	15.8	8.8	13.8
$\sum$ NADP(H) (nmol g^{-1} FW)	52.7	41.6	46.2	41.7
$\sum$ Total pyridine pool (nmol g^{-1} FW)	60.7	57.4	55.0	55.5

Processed by cytosolic NADP-ICDH, this reaction also yields NADPH. The higher stimulation of NADP-ICDH activity in *Carpaccio* may contribute to maintain higher levels of NADPH in the cytosol of the tolerant genotype. Starting from malate, the anapleurotic pathway of the Krebs cycle can also use NADP-ME, which is also likely to increase the pool of cytosolic NADPH. NADP-ME activation has been shown in several C_3 and C_4 plants in response to several abiotic stresses known to modify cell redox homeostasis (Valderrama et al. 2006, Maier et al. 2011), especially in response to O_3 (Dizengremel et al. 2009, Guidi et al. 2009). In addition, by supplying NADPH and pyruvate, NADP-ME participates in fatty acid biosynthesis (Edwards and Andreo 1992) and also in defense-related lignin and flavonoid formation in stress conditions (Casati et al. 1999). In our work, the stimulation of NADP-ME activity occurred in the two poplar genotypes, but the effect was more important in *Carpaccio*, the tolerant genotype. Furthermore, in that genotype, the correlation between PEPC activity and NADP-ME activity appeared stronger. These results argue in favor of an important role for NADP-ME in providing cytosolic NADPH in response to ozone treatment, and perhaps in conferring *Carpaccio* higher tolerance to ozone. Considering that the same relation

was not found in other species (Guidi et al. 2009), that last conclusion will have to be supported by other results.

In case of a stress, the stimulation of NADP-G6PDH activity is supposed to supply the cytosol with NADPH. However, its involvement in the pentose-phosphate pathway also implies providing higher amounts of sugar-intermediates for lignin biosynthesis, which is believed to play a defensive role in case of O_3 exposure (Cabané et al. 2004). Our work showed that its activity was also stimulated in the two genotypes in response to O_3 fumigation, but with higher values in *Carpaccio*. The high correlation between the increase in NADP-G6PDH and PEPC activity levels supports the hypothesis that in case of O_3-induced oxidative stress, several pathways, all likely to provide the cytosol with NADPH, were activated simultaneously. Conversely, NADP-GAPDH, also known to provide cytosolic NADPH, displayed much lower changes in their activity levels in response to O_3 treatment.

NADPH is considered as one of the most vital factors in cell growth, maintenance and detoxification. The large necroses and the early abscissions observed on *Robusta* leaves could result from lower NADPH availability. In *Robusta*, a drop in NADPH content was evidenced, especially at the end of O_3 exposure, while *Carpaccio* was able to maintain the same pool of reduced pyridine nucleotides as the controls all along the treatment. These results are in agreement with the fact that *Carpaccio* is more able to regenerate NADPH by increasing certain cytosolic NADP-dependent dehydrogenase activities in case of O_3 stress. In good accordance with what is commonly observed at the cell level, the NADPH/NADP ratio remained higher than the NADH/NAD ratio for which the reduced form (NADH) can reach 5–20% (Noctor et al. 2011). Moreover, the NADH/NAD ratio undergoes important variations that depend on leaf cellular compartments and light/dark conditions (Heineke et al. 1991, Igamberdiev and Gardeström 2003, Szal et al. 2008). In the cell, NADP is produced from NAD by NAD(H) kinases (Turner et al. 2004, Noctor et al. 2006), which are suggested to play an important role in providing cellular NADPH in response to a wide range of oxidative-related stresses (Hayashi et al. 2005, Chai et al. 2006, Noctor 2006). In our experimental conditions, the total amounts of phosphorylated pyridine nucleotides (NADP(H)) decreased in the two genotypes, probably in favor of the non-phosphorylated pool. Therefore the NAD(H) phosphorylation process did not seem to be involved in response to ozone treatment.

To conclude, our work showed that O_3 treatment caused a significant increase in the activity of all key cytosolic NADP-dependent enzymes we assayed, except NADP-GAPDH. That increase may be justified by an increased NADPH demand for detoxification and repair processes. In fact, we determined that only *Carpaccio*, qualified in our work as the more tolerant genotype, was able to maintain its NADPH pool during O_3 treatment, while *Robusta* was not. Differential responses could be associated to a higher stimulation of both NADP-ME and NADP-G6PDH in the more tolerant genotype. Using mutants with a low activity level for these enzymes would make it possible to assess their role in ozone-tolerance mechanisms.

Acknowledgements – This work is part of the Vulnoz project funded by the following French institutions: Agence Nationale de la Recherche, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors thank Stéphane Martin, Fabien Spicher and Jacques Banvoy for technical support, Pierre Montpied for advice about statistical analyses and Annie Buchwalter for English proof-reading.

References

Abat JK, Saigal PT, Deswal R (2008) S-nitrosylation another biological switch like phosphorylation? Physiol Mol Biol Plants 14: 119–130

Ashmore MR (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. Plant Cell Environ 28: 949–964

Bagard M, Le Thiec D, Delacôte E, Hasenfratz-Sauder MP, Banvoy J, Gérard J, Dizengremel P, Jolivet Y (2008) Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. Physiol Plant 134: 559–574

Batz O, Logemann E, Reinold S, Hahlbrock K (1998) Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. Chem Biol 379: 1127–1135

Baumgarten M, Huber C, Büker P, Emberson L, Dietrich HP, Nunn AJ, Heerdt C, Beudert B, Matyssek R (2009) Are Bavarian Forests (southern Germany) at risk from ground-level ozone? Assessment using exposure and flux based ozone indices. Environ Pollut 157: 2091–2107

Bohler S, Bagard M, Oufir M, Planchon S, Hoffmann L, Jolivet Y, Hausman JF, Dizengremel P, Renaut J (2007) A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. Proteomics 7: 1584–1599

Bortier K, Ceulemans R, de Temmerman L (2000) Effects of tropospheric ozone on woody plants. In: Agrawal M (ed) Environmental Pollution and Plant Responses. Lewis Publishers, Boca Raton FL, pp 153–182

Brendley BW, Pell EJ (1998) Ozone-induced changes in biosynthesis of Rubisco and associated compensation to stress in foliage of hybrid poplar. Tree Physiol 18: 81–90

Bustos DM, Iglesias AA (2003) Phosphorylated non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins. Plant Physiol 133: 2081–2088

Bustos DM, Bustamante CA, Iglesias AA (2008) Involvement of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to oxidative stress. J Plant Physiol 165: 456–461

Cabané M, Pireaux JC, Leger E, Weber E, Dizengremel P, Pollet B, Lapierre C (2004) Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. Plant Physiol 134: 586–594

Casati P, Spampinato CP, Andreo CS (1997) Characteristics and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. Plant Cell Physiol 38: 928–934

Casati P, Drincovich MF, Edwards GE, Andreo CS (1999) Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. Photosynth Res 61: 99–105

Castagna A, Ranieri A (2009) Detoxification and repair process of ozone injury: From O_3 uptake to gene expression adjustment. Environ Pollut 157: 1461–1469

Chai MF, Wei PC, Chen QJ, An R, Chen J, Yang S, Wang XC (2006) NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in Arabidopsis. Plant J l47: 665–674

Di Baccio D, Castagna A, Paoletti E, Sebastiani L, Ranieri A (2008) Could the differences in O3 sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O_3 influx? Tree Physiol 28: 1761–1772

Dizengremel P (2001) Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. Plant Physiol Biochem 39: 729–742

Dizengremel P, Le Thiec D, Bagard M, Jolivet Y (2008) Ozone risk assessment for plants: central role of metabolism-dependent changes in reducing power. Environ Pollut 156: 11–15

Dizengremel P, Le Thiec D, Hasenfratz-Sauder MP, Vaultier MN, Bagard M, Jolivet Y (2009) Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure. Plant Biol 11: 35–42

Doubnerová V, Ryslava H (2011) What can enzymes of C_4 photosynthesis do for C_3 plants under stress? Plant Sci 180: 575–583

Edwards GE, Andreo CS (1992) NADP-malic enzyme from plants. Phytochem 31: 1845–1857

Emes MJ, Neuhaus HE (1997) Metabolism and transport in nonphotosynthetic plastids. J Exp Bot 48: 1995–2005

Fares S, Loreto F, Kleist E, Wildt J (2008) Stomatal uptake and stomatal deposition of ozone in isoprene and monoterpene emitting plants. Plant Biol 10: 44–54

Fontaine V, Pelloux J, Podor M, Afif D, Gérant D, Grieu P, Dizengremel P (1999) Carbon fixation in *Pinus halepensis* submitted to ozone. Opposite response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase. Physiol Plant 105: 187–192

Fontaine V, Cabané M, Dizengremel P (2003) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Pinus halepensis* needles submitted to ozone and water stress. Physiol Plant 117: 445–452

Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. Plant Physiol 155: 2–18

Fuhrer J, Skarby L, Ashmore MR (1997) Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. Environ Pollut 97: 91–106

Fukayama H, Hatch MD, Tamai T, Tsuchida H, Sudoh S, Furbank RT, Miyao M (2003) Activity regulation and physiological impacts of maize C4-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. Photosynth Res 77: 227–239

Gaucher C, Costanzo N, Afif D, Mauffette Y, Chevrier N, Dizengremel P (2003) The impact of elevated ozone and carbon dioxide on young Acer saccharum seedlings. Physiol Plant 117: 392–402

Gerosa G, Finco A, Mereu S, Marzuoli R, Ballarin-Denti A (2009) Interactions among vegetation and ozone, water and nitrogen fluxes in a coastal Mediterranean maquis ecosystem. Biogeosciences 6: 1783–1798

Guidi L, Degl'Innocenti E, Martinelli F, Piras M (2009) Ozone effects on carbon metabolism in sensitive and insensitive *Phaseolus vulgaris* cultivars. Environ Exp Bot 66: 117–125

Gupta VK, Singh R (1988) Partia1 purification and characterization of NADPC-isocitrate dehydrogenase from immature pod walls of chickpea *(Cicer arietinum* L.). Plant Physiol 87: 741–744

Häikiö E, Freiwald V, Julkunen-Tiitto R, Beuker E, Holopainen T, Oksanen E (2009) Differences in leaf characteristics between ozone sensitive and tolerant hybrid aspen (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) clones. Tree Physiol 29: 53–66

Hayashi M, Takahashi H, Tamura K, Huang J, Yu LH, Kawai-Yamada M, Tezuka T, Uchimiya H (2005) Enhanced dihydroflavonol-4-reductase activity and NAD homeostasis leading to cell death tolerance in transgenic rice. Proc Natl Acad Sci USA 102: 7020–7025

Heineke D, Riens B, Grosse H, Hoferichter P, Peter U, Flügge U-I, Heldt HW (1991) Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. Plant Physiol 95: 1131–1137

Hodges M, Flesch V, Galvez S, Bismuth E (2003) Higher plant NADP-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. Plant Physiol Biochem 41: 577–585

Igamberdiev AU, Gardeström P (2003) Regulation of NAD and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by

reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. Biochim Biophys Acta 1606: 117–125
Ishida H, Nishimori Y, Sugisawa M, Makino A, Mae T (1997) The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. Plant Cell Physiol 38: 471–479
Junqua M, Biolley JP, Pie S, Kanoun M, Durand R, Goulas P (2000) In vivo occurrence of carbonyl residues in *Phaseolus vulgaris* proteins as a direct consequence of a chronic ozone stress. Plant Physiol Biochem 38: 853–861
Karnosky DF, Gagnon ZE, Dickson RE, Coleman MD, Lee EH, Isebrands JG (1996) Changes in growth, leaf abscission, and biomass associated with seasonal tropospheric ozone exposures of *Populus tremuloides* clones and seedlings. Can J Forest Res 26: 23–37
Karnosky DF, Pregitzer KS, Zak DR, Kubisce ME, Hendrey GR, Weinstein D, Nosal M, Percy KE (2005) Scaling ozone responses of forest trees to the ecosystem level in a changing climate. Plant Cell Environ 28: 965–981
Karnosky D, Skelly J, Percy K, Chappelka A (2007) Perspectives regarding 50 years of research on effects of tropospheric ozone air pollution on US forests. Environ Pollut 147: 489–506
Landolt W, Gunthardt-Goerg MS, Pfenninger I, Einig W, Hampp R, Maurer S, Matyssek R (1997) Effect of fertilization on ozone-induced changes in the metabolism of birch (*Betula pendula*) leaves. New Phytol 137: 389–397
Maier A, Zell MB, Maurino VG (2011) Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C_4 and C_3 photosynthesis. J Exp Bot 62: 3061–3069
Matyssek R, Innes JL (1999) Ozone – a risk factor for trees and forests in Europe? Water Air Soil Poll 116: 199–226
Matyssek R, Wieser G, Nunn AJ, Kozovits AR, Reiter IM, Heerdt C, Winkler JB, Baumgarten M, Haberle K-H, Grams TEE, Werner H, Fabian P, Havranek WM (2004) Comparison between AOT40 and ozone uptake in forest trees of different species, age and site conditions. Atmos Environ 38: 2271–2281
Matyssek R, Le Thiec D, Löw M, Dizengremel P, Nunn AJ, Häberle KH (2006) Interaction between drought stress and O_3 stress in forest trees. Plant Biol 8: 11–17
McLaughlin SB, Nosal M, Wullschleger SD, Sun G (2007) Interactive effects of ozone and climate on tree growth and water use in a southern Appalachian forest in the USA. New Phytol 174: 109–124
Mhamdi A, Mauve C, Houda G, Saindrenan P, Hodges M, Noctor G (2010) Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in Arabidopsis leaves. Plant Cell Environ 33: 1112–1123
Møller IM, Rasmusson AG (1998) The role of NADP in the mitochondrial matrix. Trends Plant Sci 3: 21–27
Nemoto Y, Sasakuma T (2000) Specific expression of *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Sci 158: 53–60
Noctor G (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. Plant Cell Environ 29: 409–425
Noctor G, Queval G, Gaklere B (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. J Exp Bot 57: 1603–1620
Noctor G, Hager J, Shengchun L (2011) Biosynthesis of NAD and its manipulation in plants. Adv Bot Res 58: 153–201
Pell EJ, Eckardt N, Enyedi AJ (1992) Timing of ozone stress and resulting status of Ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase and associated net photosynthesis. New Phytol 120: 397–405
Pell EJ, Sinn JP, Brendley BW, Samuelson L, Vinten-Johansen C, Tien M, Skillman J (1999) Differential response of four tree species to ozone-induced acceleration of foliar senescence. Plant Cell Environ 22: 779–790
Pelloux J, Jolivet Y, Fontaine V, Banvoy J, Dizengremel P (2001) Changes in Rubisco and Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. Plant Cell Environ 24: 123–131
Peñarrubia L, Moreno J (1990) Increased susceptibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase to proteolytic degradation caused by oxidative treatments. Arch Biochem Biophys 281: 319–323
Pitel JA, Cheliak WM (1986) Effectiveness of protective agents for increasing activity of five enzymes from vegetative tissues of white spruce. Can J Bot 64: 39–44
Plöchl M, Lyons T, Ollerenshaw J, Barnes JD (2000) Simulating ozone detoxification in the leaf apoplast through the direct reaction with ascorbate. Planta 210: 454–467
Queval G, Noctor G (2007) A plate-reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione and ascorbate in tissue extracts. Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. Anal Biochem 363: 58–69
R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/
Reich PB (1983) Effects of low concentration of O_3 on net photosynthesis, dark respiration, and chlorophyll

contents in aging hybrid poplar leaves. Plant Physiol 73: 291–296
Renaut J, Bohler S, Hausman JF, Hoffmann L, Sergeant K, Ashan N, Jolivet Y, Dizengremel P (2009) The impact of atmospheric composition on plants: a case study of ozone and poplar. Mass Spectrom Rev 28: 495–516
Ribas A, Peñuelas J, Elvira S, Gimeno BS (2005) Contrasting effects of ozone under different water supplies in two Mediterranean tree species. Atmos Environ 39: 685–693
Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Van Laere A, Vangronsveld J (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. Plant Physiol Biochem 43: 437–444
Smirnoff N (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. Ann Bot 78: 661–669
Street NR, Tallis MJ, Tucker J, Brosché M, Kangasjärvi J, Broadmeadow M, Taylor G (2011) The physiological, transcriptional and genetic responses of an ozone-sensitive and an ozone tolerant poplar and selected extremes of their F2 progeny. Environ Pollut 159: 45–54
Szal B, Dabrowska Z, Malmberg G, Gardeström P, Rychter A (2008) Changes in energy status of leaf cells as a consequence of mitochondrial genome arrangement. Planta 227: 697–706
Turner WL, Waller JC, Vanderbeld B, Snedden WA (2004) Cloning and characterization of two NAD kinases from Arabidopsis: identification of a calmodulin binding isoform. Plant Physiol 135: 1243–1255
UNECE (2004) Mapping Manual, UNECE Convention for Long-Range Transboundary Air Pollution, Manual on methodologies and criteria for modelling and mapping critical loads and levels and air pollution effects, risks and trends http ://www.oekodata.com/icpmapping/pub/manual_2004/mapman_2004.pdf
UNECE (2005) Forest Trees Working Group Report. Critical Level of Ozone: Further applying and developing the fluxed-based concept, Obergurgl, Tyrol, Austria, pp 15–19
Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gomez-Rodriguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernandez-Ocana A, Del rio LA, Barroso JB (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. Plant Cell Environ 29: 1449–1459
Voll LM, Zell MB, Engelsdorf T, Saur A, Wheeler MG, Drincovich MF, Weber APM, Maurino VG (2012) Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in *Arabidopsis thaliana* is associated with enhanced susceptibility to *Colletotrichum higginsianum*. New Phytol 195: 189–202
Vollenweider P, Woodcock H, Kelty MJ, Hofer RM (2003) Reduction of stem growth and site dependency of leaf injury in Massachusetts black cherries exhibiting ozone symptoms. Environ Pollut 125: 467–480
Wakao S, Andre C, Benning C (2008) Functional analyses of cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenases and their contribution to seed oil accumulation in Arabidopsis. Plant Physiol 146: 277–288
Wildhagen H, Dürr J, Ehlting B, Rennenberg H (2010) Seasonal nitrogen cycling in the bark of field-grown Grey poplar is correlated with meteorological factors and gene expression of bark storage proteins. Tree Physiol 30: 1096–1110
Wittig VE, Ainsworth EA, Naidu SL, Karnoski DF, Long SP (2009) Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. Glob Change Biol 15: 396–424
Yun S-C, Laurence J (1999) The response of clones of *Populus tremuloides* differing in sensitivity to ozone in the fields. New Phytol 141: 411–421

Edited by P. Gardeström

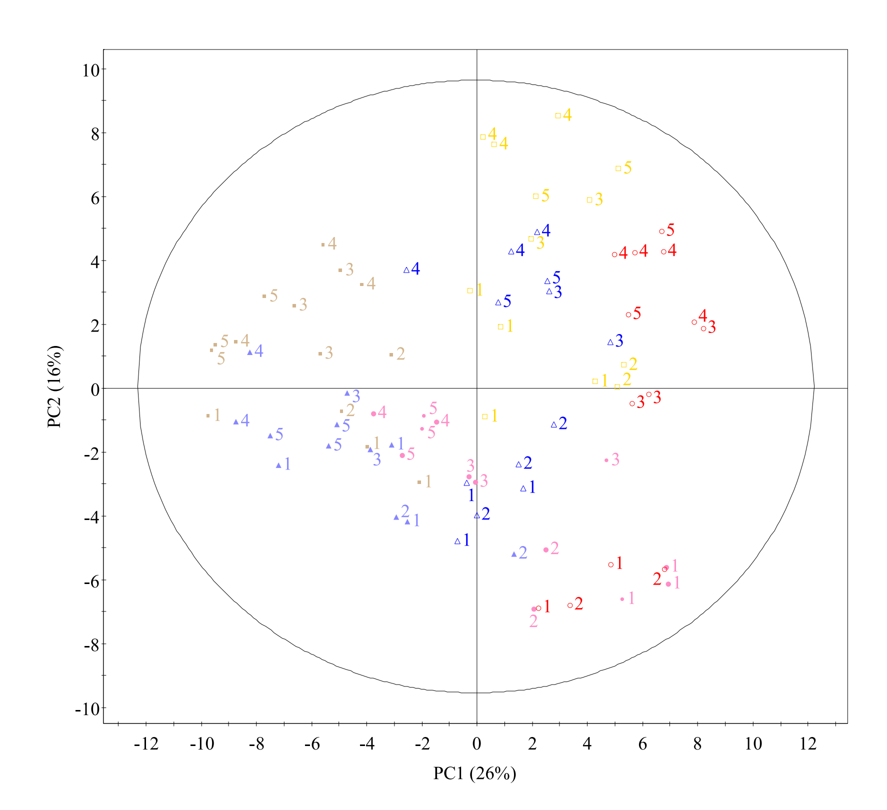


Figure 50: Analyse en composantes principales basée sur les concentrations des métabolites primaires chez trois génotypes de peuplier (Carpaccio en rouge et rose, Cima en jaune et beige et Robusta en bleu foncé et bleu clair) soumis à un traitement ozone (couleurs vives) ou ambiant (couleurs pastelles) à cinq dates de prélèvements (1, 2, 3, 4, 5 pour 2, 4, 11, 15 et 17 jours de traitement respectivement)

4. CHANGEMENTS INDUITS PAR L'OZONE DANS LES METABOLITES PRIMAIRES DE TROIS GENOTYPES DE PEUPLIER

Malgré les barrières mécaniques et biochimiques que représentent la régulation de la conductance stomatique et le système complexe de détoxication, l'ozone entraîne une privation d'énergie. En réponse à l'ozone, les flux de carbone du métabolisme primaire vers le métabolisme secondaire sont stimulés pour répondre aux besoins de réparation et de détoxication (Iriti et Faoro, 2009).

Afin de mieux caractériser les modifications du métabolisme primaire en réponse à l'ozone, nous avons procédé à une analyse des métabolites primaires, par GC/MS, chez trois génotypes de peuplier euraméricain. Le métabolisme carboné étant la base de la réponse de détoxication et de réparation, cette analyse a aussi pour but de mettre en évidence un marqueur potentiel de résistance à l'ozone.

Comme le montre la figure 50, l'ozone a un fort effet sur le métabolisme primaire et explique 26% de la variance des échantillons (PC1). De plus, chez le génotype le plus résistant, Carpaccio, l'effet de l'ozone n'est visible qu'à partir de la 3ème date de prélèvement (11ème jour de traitement), tandis que chez Robusta et Cima, la séparation entre les deux traitements est déterminée dès le premier prélèvement (2ème jour de traitement). Un effet temps au sein des échantillons soumis au traitement ozone est responsable de 16.5% de la variance des échantillons (PC2). Parmi les modifications observées, on note une augmentation de la plupart des métabolites impliqués dans le cycle de Krebs (Fig. 51), ce qui est cohérent avec une forte activité respiratoire. Une des modifications majeures des métabolites primaires en réponse à l'ozone est l'accumulation de sucres (glucose, fructose, galactose, raffinose, mannose, sucrose) (Fig. 52).

Les sucres solubles sont très sensibles aux stress environnementaux qui agissent sur l'apport de glucides des organes-sources vers les organes-puits (Rosa *et al.*, 2009). La hausse des concentrations en sucre solubles dans les feuilles en réponse à l'ozone peut être due à une inhibition de la mise en réserve du carbone et à une inhibition de l'export en carbone nouvellement assimilé (Einig *et al.*, 1997; Dizengremel, 2001). Les sucres solubles, en plus de leur rôle en tant que ressource métabolique et constituants cellulaires, agissent comme signaux de régulation du métabolisme en réponse aux facteurs environnementaux. L'ozone

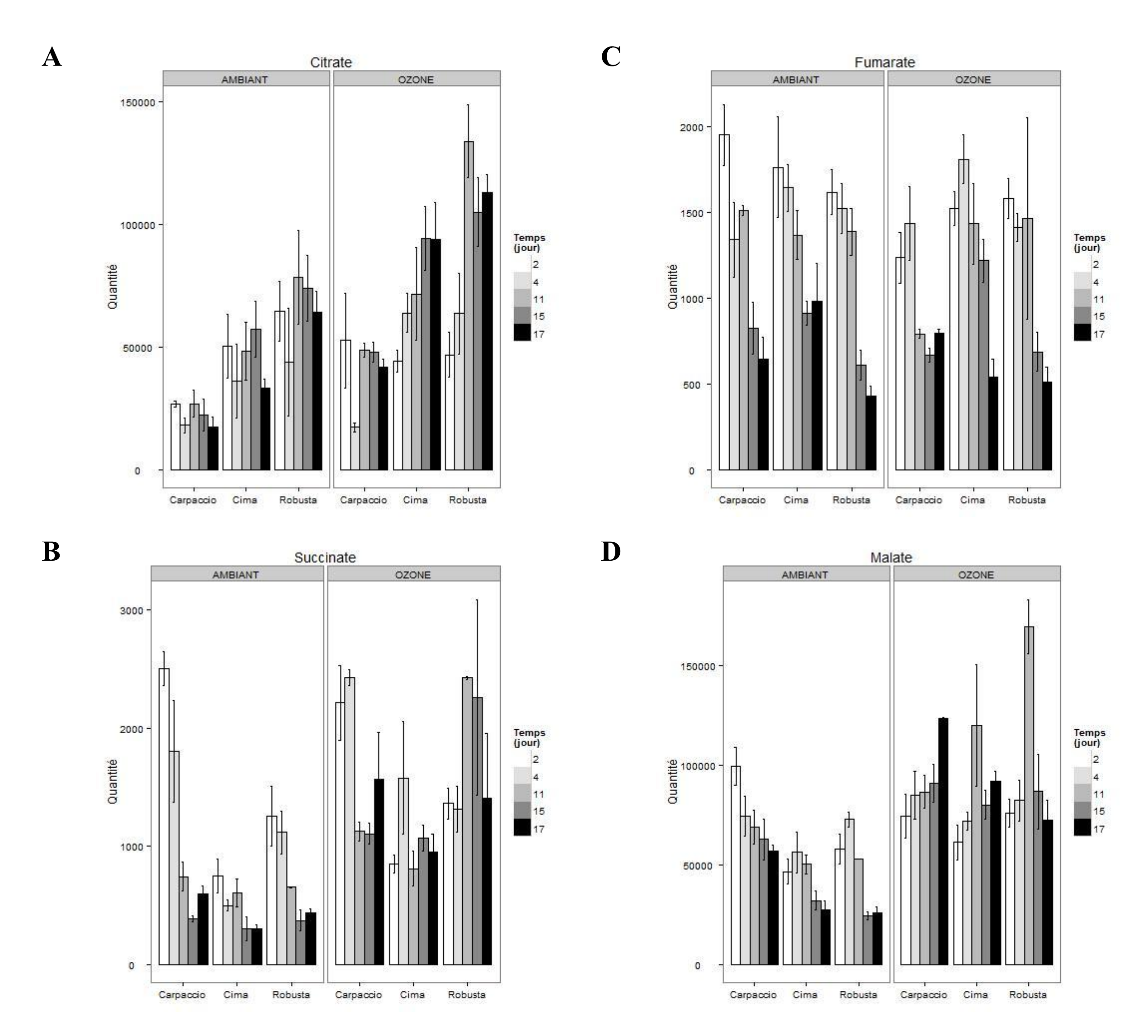


Figure 51 : Concentration en (A) citrate, (B) succinate, (C) fumarate, (D) malate, dans les feuilles de trois génotypes de peupliers (Carpaccio, Cima et Robusta) après 2, 4, 11, 15 et 17 jours de traitement ozone ou ambiant.

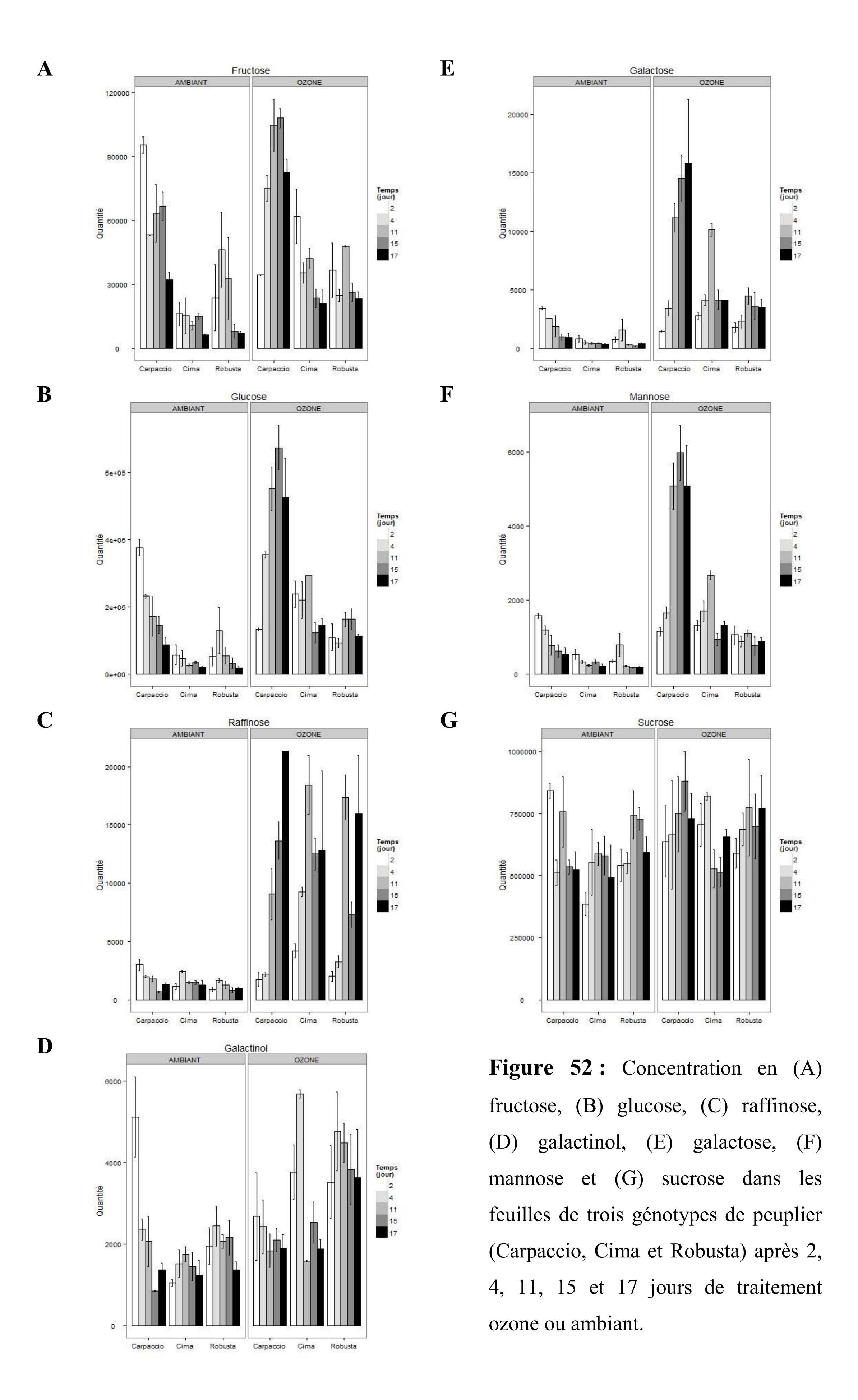


Figure 52 : Concentration en (A) fructose, (B) glucose, (C) raffinose, (D) galactinol, (E) galactose, (F) mannose et (G) sucrose dans les feuilles de trois génotypes de peuplier (Carpaccio, Cima et Robusta) après 2, 4, 11, 15 et 17 jours de traitement ozone ou ambiant.

entraîne une hausse des besoins en glucides et une baisse de l'assimilation en carbone. Des changements physiologiques et biochimiques se mettent alors en place pour permettre de soutenir les besoins prioritaires de la respiration et des processus métaboliques nécessaires pour faire face au stress, comme dans le cas de l'ozone, les processus de détoxication et de réparation. Les sucres solubles agissent comme molécules de signal régulant l'expression de gènes, et principalement ceux impliqués dans la photosynthèse, le métabolisme du sucrose et la synthèse d'osmolytes (Gupta *et al.*, 2005). Les sucres solubles sont des signaux distincts et n'agissent pas tous de la même manière. Le sucrose et le glucose en plus de leur rôle osmoprotecteur servent de substrat à la respiration cellulaire. Le glucose peut alimenter les hexokinases mitochondriales et chloroplastiques afin de réduire la production de ROS dans ces compartiments cellulaires (Valluru et Van den Ende, 2011). Le fructose, quand à lui, pourrait être lié, par l'intermédiaire de la production d'erythrose-4-Phosphate, à la synthèse de métabolites secondaires comme la lignine ou les composés phénoliques dont la synthèse est induite par l'ozone (Hilal *et al*., 2004). Le raffinose et le galactinol pourraient agir comme détoxiquants lorsqu'ils sont accumulés lors d'un stress, notamment au sein des chloroplastes (Nishizawa *et al.*, 2008; Valluru et Van den Ende, 2011).

Or, le génotype le plus résistant (Carpaccio) se caractérise par des concentrations constitutives en sucre (notamment glucose, fructose, mannose et galactose) plus importantes que les deux autres génotypes. La disponibilité en sucres solubles plus importante peut s'avérer un facteur de résistance au stress ozone, grâce aux caractéristiques antioxydantes de certains sucres, mais aussi pour pouvoir répondre plus facilement aux besoins nécessaires à la réparation et à la détoxication.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans les années à venir, une augmentation des concentrations de fond en ozone troposphérique est prédite du fait de la production par l'activité humaine d'oxydes d'azote (NO_x) et de composés organiques volatils (VOC_s), mais aussi du fait de l'augmentation des températures de la planète qui favorise les réactions photochimiques. Conscients des enjeux liés à cette hausse, les pouvoirs politiques, dont les instances européennes, tentent de limiter ces productions afin de limiter les conséquences économiques et environnementales. Pour ce faire, un certain nombre d'indicateurs de seuil de risque aident à déterminer les concentrations en ozone à ne pas dépasser pour ne pas engendrer d'effets délétères pour la santé humaine, mais aussi pour la végétation. Néanmoins, si des indicateurs de seuil de risque pour la végétation basés uniquement sur les concentrations en ozone troposphérique, tels que l'AOT40 ou le SUM60, donnent une indication du danger, les indicateurs mesurant les flux d'ozone par le calcul de la conductance stomatique, tels que le CUO, l'AFstY ou le POD, permettent quand à eux de déterminer le risque d'exposition. En revanche, pour évaluer le risque réel encouru, il faut mesurer le flux effectif d'ozone qui prend en compte les deux moyens de défense mis en œuvre par les plantes, à savoir : la régulation de la conductance stomatique et les processus de détoxication.

L'objectif principal de cette thèse était de donner des pistes d'amélioration de l'estimation des seuils de risque à l'ozone pour la végétation en approfondissant nos connaissances sur les effets de l'ozone sur la régulation stomatique et les processus de détoxication. De plus, l'étude de trois génotypes de peuplier euraméricain, caractérisés par une sensibilité plus ou moins forte à l'ozone, avait pour but de définir un ensemble de marqueurs de tolérance.

Les indicateurs de seuils de risque utilisant les flux d'ozone sont basés sur l'utilisation de modèles de prédiction de conductance stomatique, car les mesures de conductance stomatique en continu sur le terrain ne sont pas réalisables. Deux grands types de modèles de conductance stomatique existent. Parmi ceux-ci, l'un des principaux est le modèle de « Ball-Berry » (Ball *et al.*, 1987) qui se base sur l'assimilation nette de CO_2, tandis que d'autres, tels que le modèle de « Jarvis » (Jarvis, 1976), représentent la conductance stomatique comme le produit de la conductance maximale, relevée dans la littérature, par des fonctions réductrices décrivant la réponse de la conductance stomatique aux facteurs environnementaux et phénologiques. Il est admis qu'en plus de dommages visuels,

l'ozone impacte les processus physiologiques entraînant une baisse différente de la conductance stomatique et de l'assimilation de CO_2 (Wittig *et al*., 2007). Ainsi, il a été observé un découplage entre les deux (Lombardozzi *et al.*, 2012). Comme nous l'avons aussi montré (Dghim *et al*., 2012), l'ozone impacte directement la photosynthèse, en plus de la conductance stomatique, en induisant une modification de l'activité des enzymes carboxylantes (Rubisco et PEPC) et en modifiant, chez les espèces les plus sensibles, la disponibilité en NADPH, ce qui pourrait ralentir la régénération du RibuloseBisPhosphate. La relation étroite liant l'assimilation et la conductance stomatique n'est donc plus valide en présence d'ozone et rend les modèles de prédiction de la conductance stomatique utilisant cette relation, tels que le modèle de Ball-Berry, inadaptés. De la même manière, nous avons montré que l'ozone modifie la réponse des stomates aux variations de différents facteurs environnementaux (Dumont *et al*., 2013). Là encore, les fonctions sur lesquelles se fondent les modèles multiplicatifs de prédiction de conductance stomatique ne sont plus valides lors d'un stress ozone et rendent les modèles incertains. Cependant, ces modèles peuvent être améliorés pour prendre en compte les effets directs de l'ozone sur la photosynthèse et sur la réponse stomatique aux variations de paramètres environnementaux (Pleijel *et al.,* 2002 ; Danielsson *et al*. 2003 ; Lombardozzi *et al.*, 2012). Nous avons montré que l'utilisation d'une conductance maximale fixe est inappropriée car celle-ci est réduite par l'ozone et qu'il faudrait paramétrer chaque fonction réductrice avec une fonction ozone pour traduire les ralentissements d'ouverture et de fermeture observés. De plus, nous avons mis en évidence que chez Robusta, le génotype le plus sensible, l'ozone n'induit pas de ralentissement supplémentaire, celui-ci ayant des vitesses initiales de réponse très lentes. Il faut donc poursuivre les études visant à caractériser plus finement ces effets, pour définir ces nouvelles fonctions et vérifier que notre étude soit transposable sur des arbres plus âgés, en conditions naturelles et sur d'autres espèces.

Afin de définir précisément l'effet de l'ozone sur les mouvements stomatiques, il convient de comprendre les étapes altérées en amont qui entraînent le ralentissement de l'ouverture et de la fermeture des stomates en réponse à différents stimuli. Nous avons montré que les flux ioniques dans les cellules de garde sont modifiés sous ozone et que l'expression des gènes des canaux calciques vacuolaires était fortement inhibée. Ainsi, il est important de vérifier si les perturbations des flux ioniques concernent majoritairement

certains compartiments cellulaires en mesurant le contenu minéral de chaque compartiment séparément, grâce à l'utilisation d'un microscope électronique à balayage à haute résolution (à effet de champ), couplé à des platines de cryofracture pour éviter les mouvements d'éléments solubles et mobiles. De plus, une étude de cinétique journalière complète (jour + nuit) permettrait de tester un éventuel effet d'accumulation de certains ions sous stress ozone. Enfin, les flux d'ions aboutissant à des flux d'eau, l'ozone pourrait aussi agir sur les aquaporines qui sont principalement des canaux plasmiques et tonoplastiques (PIP, TIP) facilitant les mouvements d'eau. L'expression des gènes de cette large famille de protéines semble régulée sous l'effet de différentes contraintes abiotiques (Cohen *et al.*, 2013). Elle pourrait donc l'être aussi par l'ozone au sein des cellules de garde et ainsi modifier les vitesses d'ouverture et de fermeture des stomates.

Pour améliorer les indicateurs de seuils de risque, il faut aussi prendre en compte les processus de détoxication qui limitent les effets biologiques dus à l'ozone. Pour tenir compte de la part d'ozone détoxiquée, les indicateurs incluent un seuil de concentration en ozone dans leur calcul. Néanmoins, les capacités de détoxication variant d'une espèce à une autre, d'un génotype à un autre, le seuil ne peut être fixe. Il faut donc intégrer différemment les processus de détoxication dans le calcul des indicateurs de seuils de risque. L'ascorbate apoplastique est le premier acteur de la détoxication à agir sur les ROS produits par l'ozone. Certains modèles se basent donc sur les concentrations en ascorbate pour essayer de représenter la détoxication (Tuzet *et al*., 2011). Néanmoins, ces modèles restent limités, puisque l'ascorbate apoplastique n'est pas le seul métabolite impliqué dans les processus de détoxication. Les acteurs de la détoxication sont nombreux, et nous avons mis en évidence que la capacité de détoxication résulte de la combinaison de facteurs multiples, tels que les concentrations de différents antioxydants, leur régénération, l'activité d'enzymes détoxifiantes. Il faut cependant rappeler que la sensibilité à l'ozone, si elle peut être due à une mauvaise régulation de la conductance stomatique, à des conductances maximales plus importantes, ou à des capacités de détoxication trop faibles, elle peut aussi être limitée par une forte disponibilité en ressources énergétiques et une bonne remobilisation des ressources. Dans l'absolu, l'ensemble de ces paramètres devraient être pris en compte afin d'obtenir un modèle le plus proche possible de la réalité physiologique des végétaux, mais l'intégration de multiples mécanismes ne semble pas

être applicable à de grandes échelles de temps et d'espace car nécessitant trop de paramétrages.

Les différences de tolérance sont difficiles à appréhender du fait de la complexité des mécanismes mis en jeu. Robusta, le génotype de peuplier le plus sensible parmi les trois que nous ayons étudiés, se caractérise par une chute de feuilles précoce et importante. D'après nos résultats, sa sensibilité peut s'expliquer par différents facteurs. Au niveau stomatique, il se distingue par une conductance stomatique plus élevée et surtout par des vitesses de réactions très faibles. La lenteur de ses réponses ne lui permet pas de tirer partie des conditions favorables au cours d'une journée et entraîne probablement des pertes en eau plus importantes et une entrée d'ozone plus forte. De plus, il n'arrive pas à maintenir un pool de NADPH nécessaire au processus de régénération des antioxydants, dont l'ascorbate, laissant s'accumuler la forme oxydée. Carpaccio, à l'inverse, est le génotype le plus résistant que nous ayons étudié. Sa tolérance se traduit par la combinaison de nombreux facteurs de résistance, tant au niveau stomatique qu'au niveau métabolique. Il se caractérise par des vitesses de réponse des stomates rapides, lui permettant de saisir toutes les opportunités pour perdre le moins d'eau possible, laisser entrer peu d'ozone et assimiler suffisamment de carbone. A ceci s'ajoute de bonnes capacités de détoxication avec notamment des concentrations constitutives en ascorbate et en glutathion importantes. Il arrive à maintenir un pool de NADPH suffisant pour régénérer ses antioxydants. Il dispose aussi constitutivement de concentrations en sucres plus importantes et remobilise fortement ses acides aminés vers les processus de réparation et de détoxication, tout en trouvant des ressources énergétiques alternatives. Cima quant à lui, se définit par un niveau de sensibilité intermédiaire entre Carpaccio et Robusta, avec une réduction de biomasse toutefois importante. Les facteurs justifiant sa sensibilité sont moins clairs que pour Robusta. En effet, contrairement à Robusta, il cumule certains facteurs de tolérance comme des concentrations constitutives en ascorbate importantes, un maintien des formes réduites de l'ascorbate et du glutathion, des vitesses de réactions des stomates importantes. Néanmoins, il semblerait que Cima se distingue de Carpaccio par une ressource primaire plus faible, notamment au niveau des sucres, et par un profil en composés phénoliques particulier, qui pourrait constituer un pool antioxydant moins performant, bien que cette hypothèse nécessite d'être vérifiée. Ainsi, la notion de résistance à l'ozone résulte bien de la combinaison de marqueurs de tolérance multiples.

En ne prenant pas ses facteurs dans leur globalité, on ne peut donc pas prédire la tolérance d'un génotype.

Cette thèse aura permis de mettre en évidence des pistes à suivre pour l'amélioration des seuils de risque à l'ozone pour la végétation, en approfondissant les connaissances concernant les effets de l'ozone sur la régulation stomatique et concernant les processus de détoxication. L'importance du métabolisme primaire en soutien aux mécanismes de détoxication et de réparation a été soulignée et nous avons montré que les phénomènes de tolérance ou de sensibilité à l'ozone, ne peuvent être appréhendés que par une étude approfondie avec un point de vue global sur tous ces facteurs. Les conclusions de ces travaux nécessitent d'être confirmées en conditions naturelles, toutes les expériences ayant été conduites en conditions contrôlées. Il faudrait aussi vérifier leur pertinence au sein d'autres espèces et sur des arbres plus âgés. Dans notre étude, l'ozone seul, à des concentrations correspondant à un stress chronique, a été étudié pour nous permettre de comprendre finement les mécanismes de réponse à ce stress, mais il est important de noter que les prédictions face au changement climatique indiquent entre autre, une tendance à une augmentation des températures, des concentrations en CO_2 et de la fréquence des sécheresses, ainsi que de leur intensité. Différentes études se sont intéressées aux interactions entre l'ozone et d'autres stress, comme le fort CO_2 ou la sécheresse (Matyssek *et al.*, 2006; Imai et Kobori, 2008; Kontunen-Soppela *et al.*, 2010; Lindroth, 2010; Iyer *et al.*, 2013). Les interactions entre différents stress dépendent de l'intensité de ces derniers, de leur durée, mais aussi de l'ajustement temporel des uns par rapport aux autres. La chronologie peut avoir un effet non négligeable du fait des variations du métabolisme au fil des saisons pour répondre à des besoins saisonniers. Deux stress en interaction peuvent, en fonction des scénarios, avoir des effets antagonistes, additifs ou synergétiques. Si l'on prend l'exemple de l'interaction ozone/sécheresse, au printemps nous observons souvent une hausse des concentrations en ozone, du fait de l'augmentation de l'éclairement, des températures et des émissions biologiques des Composés Organiques Volatils (COV), qui peut impacter le comportement stomatique et induire une faiblesse pour lutter contre les sécheresses de l'été. Les effets d'une sécheresse après un stress ozone seraient donc amplifiés par celui-ci. A l'inverse, une sécheresse précoce provoquerait une fermeture des stomates qui pourrait limiter les flux entrant d'ozone et avoir ainsi un effet protecteur. Néanmoins, ces deux stress induisent une perte de biomasse et auront donc, au final, quel

que soit le scénario, un effet délétère (Matyssek *et al*., 2006). Comprendre les mécanismes de chaque stress indépendamment est primordial pour pouvoir ensuite interpréter correctement les études de stress combinés; ceci pour être capable de prédire la réponse de la végétation au changement climatique, pour pouvoir prendre des mesures politiques dans le but de protéger les écosystèmes et pour adapter les pratiques forestière et agricole afin de limiter les pertes économiques.

ANNEXES

I. PROTOCOLE DU DOSAGE DE L'ASCORBATE ET DU GLUTATHION (FORMES OXYDEES ET REDUITES) EN MICROPLAQUE

La vitamine C et le glutathion ne sont pas stables surtout à température ambiante, par conséquent essayer de travailler rapidement et laisser les extraits sur la glace. FAIRE LES PLAQUES LE MEME JOUR QUE L'EXTRACTION et commencer par l'ascorbate. On peut cependant doser les extraits pour le glutathion pendant 1 semaine s'ils sont stockés à -80°C.

1 roborack = 21 blancs, 3 extraits de référence (extrait dont on connait la teneur en ascorbate et glutathion), 72 échantillons. Pour chaque roborack d'extraction, faire 2 plaques de dosage (réplica technique).

Attention, pour chaque produit pipeté par le robot, compter 15mL supplémentaire de volume mort!

5. EXTRACTION

- Peser dans des tubes micronics 1 mL 20 mg d'échantillon. Attention à ne pas laisser l'échantillon décongeler. Plonger le tube dans l'azote liquide, vider l'azote et faire la tare. Mettre 20 mg de poudre et attendre la stabilisation, replonger aussitôt dans l'azote. Une fois les roboracks prêts, les stocker à -80°C

- Mettre un petit film d'azote dans une cuvette et y disposer le roborack. Décapsuler les tubes. Attention à ne pas décongeler les échantillons. Ne pas hésiter à remettre le roborack sur l'azote. Une fois décapsulés, mettre à -20°C

- Mettre la centrifugeuse à 4°C et préparer le robot, remplir une cuve avec de l'acide métaphosphorique 5%. Lancer le programme, et apporter les roboracks quand nécessaire.

Le robot va ajouter à chaque tube 400 µL d'acide métaphosphorique 5% gardé au préalable dans la glace. Il va ensuite agiter.

- Vérifier que l'agitation était suffisante. Sinon, capsuler les tubes de nouveaux pour les agiter manuellement.

- Centrifuger 10 min à 4°C à 4000 g (puissance max). Une fois centrifugés, remettre dans la glace.

Solution à préparer

Acide métaphosphorique 5% (5 g dans 100 mL d'eau), se conserve 1 mois à 4°C

6. DOSAGE ASCORBATE

- Placer 4 fois plus de plaques numérotées que de nombre de roboracks d'extraits sur le robot.

- Préparer une cuvette de NEM 0.5%, une cuvette de DTT 5 mM et une cuvette de tampon phosphate 0.4 M pH7.4

- Remplacer 6 blancs par une gamme étalon:

Ascorbate (nmol) dans le puit	0	5	10	15	20	30
Ascorbate 5 mM (µL)	0	25	50	75	100	150
Acide métaphosphorique 5% (µL)	500	475	450	425	400	350

Le robot va déposer 20 µL d'extrait dans chaque plaque. Il va ajouter 20 µL de tampon phosphate dans la moitié des plaques et 20 µL de DTT dans l'autre moitié. (Commence par une plaque Tampon puis une DTT et ainsi de suite)

- Mettre les plaques à incuber 20 min à 37°C. Pendant ce temps, préparer le mix A+B. Remplacer la cuve de tampon par une cuve d'eau.

- Remettre les plaques sur le robot dans le bon ordre. Il va ajouter 10 µL de NEM sur les plaques DTT et 10 µL d'eau sur les autres.

- Laisser incuber 1 min à température ambiante.

- Ajouter sous hotte 80 µL par puits de réactif A+B. Attention ne pas trop exposer à la lumière.

- Laisser incuber 40 min à 37°C.

- Lire sur lecteur de plaque à 550 nm

Les plaques avec le DTT permettent de doser l'ascorbate + le déhydroascorbate. Les plaques sans DTT ne dosent que la forme réduite de l'ascorbate.

Solution à préparer

- 0.4 M Tampon phosphate pH 7.4:

(a)Na_2HPO_4. $12H_2O$ (35.8 g+250 mL d'eau) (di-sodium hydrogen orthophosphate 12-hydrate. BDH cat No. 102 485B)

(b)NaH_2PO_4. $1H_2O$ (5.52 g + 100 mL d'eau) (sodium dihydrogen orthophosphate 1-hydrate. BDH cat no. 102454R)

Ajouter (b) à (a) pour être à pH7.4, se conserve 1 mois à 4°C, utiliser à température ambiante

- Acide métaphosphorique 5% (5 g dans 100 mL d'eau) : se conserve 1 mois à 4°C

- 5 mM DTT (agent réducteur) : dissoudre 8 mg DTT (dithiothreitol) dans 10 mL de 0.4 M tampon phosphate pH7.4. Peut être stocké à -20°C par aliquots de 1.2 mL ou par 15 mL

- 0.5% NEM (N-ethylmaleimide) (retire le DTT en excès) : 50 mg NEM dans 10 mL d'eau (**A utiliser sous hotte!**). Peut être stocké à -20°C par aliquots de 0.6 mL ou par 15 mL

- Réactif coloré :

(A) H_3PO_4 + $FeCl_3$

18.5 mL d'acide orthophosphorique 85% + 31.5 mL d'eau. (Attention, on en donne jamais à boire à un acide!). Ajouter 0.3 g de Ferric Chloride (=0.6%)

(B) 4% 2,2 bipyridyl

1 g dans 25 mL

Chaque réactif est stable à température ambiante dans le noir pendant 2 à 3 semaines MAIS PAS LE MELANGE DES DEUX. Préparer le réactif colorant chaque jour au dernier moment en ajoutant 2.2 mL de (A) à 0.8 mL de (B)

- 5 mM d'acide ascorbique : 1 mg/mL d'acide métaphosphorique, stocker à -20°C

Références

Gatzek, S., Wheeler, G.L., and Smirnoff, N. (2002). Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in Arabidopsis thaliana provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated l-galactose synthesis. Plant J 30, 541-553

Kampfenkel, K., Van Montagu, M., and Inze, D. (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. Anal Biochem 225, 165-167.

7. DOSAGE GLUTATHION

- Placer 4 fois plus de plaques numérotées que de nombre de roboracks d'extraits sur le robot.

- Remplacer 6 blancs par une gamme étalon GSH:

- Prendre 10 µL GSH 10 mM dans 990 µL d'eau (0.1 mM final). Mettre 500 µL d'acide métaphosphorique dans 6 tubes. Ajouter 500 µL de GSH 0.1 mM dans le premier (50 µM final), prélever de ce tube 500 µL et les mélanger avec le suivant. Procéder à cette dilution en cascade pour tous les tubes sauf le 0 pour avoir :

Concentration (µM)	50	25	12.5	6.25	3.12	0
nmol par puit	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0

- Faire de même avec une gamme étalon GSSG mais à partir de: 25 µL GSSG 4 mM dans 975 µl d'eau (0.1 mM final)

Le robot va prélever 10 µL d'extrait pour chaque plaque.

- Ajouter 1 µL de VPD 0.4 M à la moitié des plaques

- Mettre toutes les plaques à incuber 1 h à RT

- Pendant ce temps, préparer le tampon 1X: pour 24 mL: 5.2 mL de KH2/K2H 0.5 M pH7 + 0.24 mL EDTA 0.5 M + 18.56 mL d'eau

- Préparer la GR : 8 µL de GR dans 492 µL de Tp 1X

- Préparer le NADPH (2 mM) : 200 µL de 50 mM dans 4.8 mL de Tp 1X

- Préparer le DTNB

- Préparer le MIX : Mélanger 16mL de tampon 1X + 460 µL de GR + 460 µL de DTNB. Ne pas mettre le MIX dans la glace et faire au dernier moment

- Mettre une cuve avec le MIX et une plaque PCR avec du NADPH sur le robot

Le robot va ajouter 150 µL de MIX en agitant. Il ajoute ensuite 5 µL de NADPH plaque par plaque avec entre chaque plaque un message demandant s'il passe à la suivante.

- Prendre chaque plaque, l'agiter et lire toutes les 30 sec pendant 10 min à 405 nm.

Solution à préparer

- 0.5 M tampon phosphate pH7:

(a) $K_2HPO_4 . 12H_2O$ à 0.5 M

(b) $KH_2PO_4 . 1H_2O$ à 0.5 M

Ajouter (b) à (a) pour être à pH7. Se conserve 1 mois à 4°C, utiliser à température ambiante

- EDTA 0.5 M pH7 : Se conserve 1 mois à 4°C

- Acide métaphosphorique 5% (5 g dans 100 mL d'eau) : Se conserve 1 mois à 4°C

- Glutathion Réductase : 100 U/220µL (Baker yeast (Sigma) dans 3.6 M $(NH_4)_2SO_4$, pH7 0.1 mM DTT) et à bien mélanger avant de prélever. Se conserve 1 mois à 4°C

- Stock glutathion réduit (GSH) 10m M : 3 mg (PM 307.3 g/mol) dans 1 mL d'eau. Se conserve à -20°C

- Stock glutathion oxydé (GSSG) 4 mM : 2.45 mg (PM 612.6 g/mol) dans 1 mL d'eau. Se conserve à -20°C

- DTNB (5,5'Dithio-2-nitro benzoic acid) 1.5 mg/mL: Préparer frais au dernier moment dans DMSO. Conserver pendant le dosage à RT

- NADPH 50 mM : 41.7 mg (PM 833.4 $C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3$ anhydre) dans 1 mL NAOH 50 mM. Se conserve à -20°C

II. PROTOCOLE D'EXTRACTION ET D'ANALYSE PAR HPLC DES CAROTENOÏDES

Toutes les étapes doivent être réalisées dans l'obscurité (lumière rouge sombre). Stocker les échantillons sous atmosphère azotée.

- Peser environ 10 mg de materiel vegetal broyé dans un tube Eppendorf (Le poids précis doit être connu).

- Ajouter 1000 µL de méthanol contenant 0.01% de BHT (butylated hydroxytoluene)

- Ajouter 20 µL de 1 mg/mL β–apo-caroten-8-al dans de l'hexane contenant 0.01% de BHT.

- Vortexer à 4 °C à 1400 rpm pendant 10 min.

- Centrifuger à 12000 rpm pendant 5 min à 4°C.

- Prendre le surnageant et commencer à le sécher sous atmosphère azotée.

- Ajouter 1000 µL d'hexane contenant 0.01% de BHT.

- Vortexer doucement à 4°C à 1400 rpm pendant 10 min.

- Centrifuger à 12000 rpm pendant 5 min à 4 °C.

- Mettre en commun les surnageants.

- Sécher les surnageants sous atmosphère azotée.

- Dissoudre les surnageants désséchés dans 600 µL de dichlorométhane.

- Ajouter 1.4 mL de mélange acétonitrile:méthanol (6:1), les proportions finales de ACN:MeOH:DCM seront 60:10:30.

- Prélever deux aliquots de 400 µL dans des bouteilles opaques. Lancer l'analyse d'un des deux sous HPLC.

- Sécher l'autre sous atmosphère azotée et le stocker à – 20 °C.

HPLC-MS

Volume d'injection 10 µL, colonne Kinetex 2.6 u C18 (150 x 4.6 mm), flux 1.6 mL/min, température de colonne 25°C, température de plateau 4°C, détection UV à 240-700 nm. A: ACN-MeOH (75:25, v/v), B= ACN-MeOH-dichlorométhane (75:10:15, v/v/v), avec un gradient de 0% B à 50% B en 4 min, isocratique 50% B pendant 6 min et 9 min d'équilibration avec 0% B avant l'échantillon suivant. APCI en mode positif, balayage total des ions de 300-1000 m/z.

III. PROTOCOLE D'ANALYSE DES SUCRES, COMPOSES PHENOLIQUES ET ACIDES AMINES

1. EXTRACTION

- Transférer 30mg de matériel végétal dans un tube Eppendorf de 2mL et le plonger dans de l'azote liquide.

- Broyer les échantillons avec une spatule refroidie au préalable dans de l'azote liquide. Ajouter une bille métallique refroidie au préalable.

- Broyer les échantillons dans les tubes Eppendorf insérés dans des blocs froids dans un TissueLyser 3 fois pendant 15 s avec une vitesse de 20 fois/s la première fois puis 24 fois/s. Entre les broyages, refroidir les échantillons dans de l'azote liquide et mélanger les échantillons.

- Faire un blanc avec seulement du solvant et le mélange de standards internes chaque jour.

- Ajouter 650 µL de 0.005% de BHT dans 80% de MeOH. (Dégazer le solvant chaque jour après usage sous atmosphère azotée pendant 5 min et stocker à -20°C).

- Ajouter 200 µL de mélange de standards internes (Pour faire le mélange : 2 mL de 1 mg/mL d'acide benzoïque-d5 dans 1:1 MeOH:H_2O, 2 mL de 1 mg/mL D-glucose-C13 dans 1:1 MeOH:H_2O,, 1 mL de biochanin A dans 100% de MeOH, 600 µL de 2.8 mg/mL glycerol-d8 dans 1:1 MeOH:H_2O et 1 mL de 0.1 mg/mL d'alanine-d3 dans 1:1 MeOH:H_2O).

- Secouer 15 sec avec le TissueLyser.

- Ajouter de nouveau 650 µL de 0.005% de BHT dans 80% de MeOH et mélanger pendant 15 sec avec le TissueLyser. (Dégazer le solvant chaque jour après usage sous atmosphère azotée pendant 5 min et stocker à -20°C).

- Extraire 15 min à 4°C à1400 rpm.

- Centrifuger pendant 2 min à 10°C à 12000 rpm (environ 13500 g).

- Prélever le surnageant et le garder sur la glace.

- Ajouter 2 fois 650 µL de 0.005% de BHT dans 100% de MeOH.

- Vérifier que l'échantillon est bien mélanger dans le solvant et mélanger 15 sec avec le TissueLyser.

- Faire une seconde extraction de 5 min à 4°C à 1400 rpm.

- Centrifuger à 12000 rpm (environ 13500 g) pendant 2 min à 10°C.

- Combiner les surnageants.

Les aliquots de surnageants qui seront utilizes pour les analyses de composes phénoliques et les analyses en GC doivent être complètement évaporés à sec le jour même de l'extraction. Prendre deux aliquots de 150 µL pour les analyses en GC, deux aliquots de 150 µL pour les analyses d'acides aminés et deux aliquots de 500 µL pour les analyses de composés phénoliques. Vérifier la température d'évaporation (30°C). Il est important qu'aucun résidu d'eau ne reste pour les analyses en GC.

Les échantillons sont stockés dans des flacons en verre. Dégazer les échantillons avec un jet d'azote avec la fermeture du flacon. Les échantillons peuvent être stockés à -70°C jusqu'aux analyses mais pas plus d'un mois pour les analyses en GC.

2. ANALYSE DES SUCRES

Après avoir sorti les échantillons du congélateur:

- Laisser à température ambiante pendant une heure avec d'ouvrir les flacons.

- Ajouter 20 µL de standard de temps de rétention (C7-C40 alcanes saturés dans de l'hexane, Sigma). Assécher (évaporation rapide)

- Ajouter 80 µL de MAHC (20 mg/mL de methoxyamine hydrochloride dans de la pyridine, faire le mélange chaque jour), laisser dériver 90 min à 37°C.

- Ajouter80 µL de MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoro-acetamide), laisser dériver60 min à 37°C. Transférer les échantillons dans des inserts et lancer l'analyse.

Notes: Les échantillons sont extraits et analysés dans un ordre aléatoire. L'utilisation d'azote liquide nécessite le port de gants de protection au dessus des gants normaux. Après avoir pesé le MAHC, bien nettoyer la balance car il est corrosif.

GC/MS

Volume d'injection: 1 µl, injection à debit divisé avec un ratio supérieur à 1:50, colonne: Restek, USA Rxi®-5Sil MS 30 m, 0.25 mmID, 0.25 µm df avec 10 m Integra-Guard, Cat # 13623-127, serial # 870087, température d'injection 260˚C, température d'interface 280˚C, température de la source ionique 230˚C, MS Quad 150˚C, programme de température du four : 2 min isothermique 60°C, puis 10°C/min jusqu'à 325°C, 6 min à 325°C et 7 min pour équilibrer à 60°C entre chaque analyse. Flux d'hélium 1 mL/min, plage de détection m/z 50-550, délai du solvent: Acétate d'éthyle (bouteille 1) et hexane (bouteille 2) sont utilisés pour nettoyer l'aiguille plus fois avant et après injection. Les échantillons de peuplier sont « sale », La gaine doit être changée tous les deux jours. L'aiguille et le canon doivent être lavés à l'acétone tous les jours. Laisser sécher à l'air libre.

3. Analyse des composés phénoliques

- Diluer les aliquots dans 250 µL de MeOH et 250 µL d'eau, lancer l'analyse

- Ajouter le PDA et le Corona dans la configuration – vérifier la taille de la boucle de l'échantillon.

C : 0.1% d'acide formique dans de l'eau

D : 0.1% d'acide formique dans de l'acétonitrile

Flux : 1.1 mL/min

Entre chaque analyse:

- Vérifier que toutes les analyses aient réussies

- Vérifier qu'il reste suffisamment de place sur le disque dur

- Vider la bouteille poubelle

- Nettoyer la surface dans le bouclier ionique avec 50:50 MeOH:H_2O

- Purger les canaux

- Nettoyer avec 98% d'acétonitrile et 0.1% de formique acide pendant 15 min à 0.4 mL/min puis avec du meOH pendant au moins 30 min jusqu'à ce que la colonne semble propre (vérifier sur le PDA : Direct control- Start data-zero data. Les lignes doivent être stables)

- Nettoyer le spectromètre de masse avec 50:50 MeOH:H_2O à 0.2 mL/min pendant 10-20 min

- Laisser le spectromètre de masse allumer 5 min de plus avec un flux nul.

- Laisser la phase soluble se stabiliser avant de lancer une nouvelle analyse (environ 10 min) et vérifier de nouveau sur le PDA la stabilisation.

- Vérifier que le Corona donne une ligne de base inférieure à 0.5 pA

- La pression de départ doit toujours rester la même (dépend de la colonne)

- Laisser les appareils en veille après les analyses chaque jour.

S’il n’y a pas d’analyses prévues pendant une journée, ne pas oublier de vider la bouteille poubelle après le nettoyage, éteindre le spectromètre de masse, éteindre les lampes du PDA. Dans le cas où aucune analyse n’est prévue pendant plus d’une journée, éteindre le Corona. Quand toutes les analyses sont finies, purger les canaux utilisés (C et D) avec de l’eau Millipore. Nettoyer les filtres des bouteilles de solvant dans un bain à ultrasons avec de l’eau Millipore puis 5 min dans du MeOH. Si un filtre avec de l’acétonitrile est mis directement dans une solution contenant des sels, il s’encrasse.

Ne pas oublier de lester les pompes binaires une fois par semaine. L’azote doit être coupé pour le Corona avant de vider les bouteilles poubelles du Corona. Le MS doit être calibré une fois par mois, pour cela :

- Préparer un mélange frais de calibration, les solutions de stockage peuvent être utilisées pendant 4 mois si elles sont gardées à 4°C.

- Utiliser la seringue réservée à cette usage.

- Régler la position de la sonde

- Régler à 195.1 et sauvegarde le fichier de réglage.

- Autocalibrer et nettoyer toutes les surfaces et tuyauteries après calibration.

4. ANALYSE DES ACIDES AMINÉS

- Appliquer exactement le protocol établit par le producteur du kit EZ :faast (sauf pour le volume de réactif 1 50 µL au lieu de 100 µL). Brièvement :

- Sortir les réactifs du frigo

- Sortir les échantillons du congélateur -20°C

- Préparer le mélange 3A-3B dans la bouteille à bouchon rouge

ex: 8 échantillons préparer pour 9 (avec le blanc) 1200 µL (3A) et 800 µL (3B)

- Mettre un flacon allongé / échantillon +1 et les identifier

- Mettre 100 µL d'échantillons sauf pour le blanc

- Ajouter 50 µL dans tous de Réactif 1

- Mettre un piston dans une seringue de 1.5 mL auquel on ajoute un embout adsorbant dans chaque flacon

- Aspirer doucement par étape jusqu'à ce que tout passe dans la seringue

- Mettre 200 µL de R2 (washing solution) dans le flacon

- Aspirer doucement

- Détacher l'embout et le laisser dans le flacon. Vider les seringues et les mettre à laver

- Ajouter 200 µL du milieu d'élution préparé le jour même

- Insérer les embouts sur des seringues de 0.6 mL avec le piston à moitié enfoncé

- Aspirer jusqu'au filtre et expulser

- Refaire jusqu'à ce que la totalité des billes soient expulsées

- Mettre les seringues à laver, jeter les embouts vident.

- Mettre 50 µL de R4 avec le microdoseur sans toucher les flacons

- Vortexer 8 s et attendre 1 min

- Vortexer 5 s et attendre 1 min

- Ajouter 100 µL de R5 avec le microdoseur sans toucher les flacons

- Vortexer 5 sec et attendre 1 min

- Prélever la phase organique (celle du dessus) dans un flacon avec une pipette pasteur.

- Mettre les flacons à sécher moins de 10 min sous un jet d'azote

- Redissoudre dans 90 µL de phase mobile HPLC

- Transférer dans un insert, mettre l'insert dans le flacon et boucher.

- Mettre du MeOH dans un flacon sans insert et boucher.

HPLC/MS

Pas d’utilisation de Corona ou PDA. Flux 0.28 mL/min.

C: 10 mM de formiate d'ammonium dans de l’eau

D: 10 mM de formiate d'ammonium dans du MeOH

Chaque jour à la fin des analyses :

- Vérifier que toutes les analyses aient réussies

- Vérifier qu’il reste suffisamment de place sur le disque dur

- Vider la bouteille poubelle

- Nettoyer la surface dans le bouclier ionique avec 50:50 MeOH:H_2O

- Purger les canaux

- Rincer les têtes de pompe avec de l'eau Millipore pur lentement à l'aide d'une seringue au moins deux fois

- Purger avec de l’eau Millipore pendant au moins 2 min

- Laver avec 98% de MeOH à 0.4 mL/min pendant au moins 30 min jusqu’à ce que la colonne semble propre en allumant de spectromètre de masse.

- Laver le spectromètre de masse avec 50:50 MeOH:H_2O à 0.2 mL/min pendant 10-20 min. Le tube de transfert d’ions doit être lavé tous les jours.

- Laisser le spectromètre de masse allumé pendant 5 min supplémentaire avec un flux nul.

- Purger les canaux utilisés (C et D)

- Laisser la phase soluble se stabiliser avant de lancer une nouvelle analyse (environ 10 min)

La pression de départ doit toujours être la même (dépend de la colonne)

- Les appareils peuvent être éteints après chaque analyse.

Ne pas oublier de lester les pompes binaires une fois par semaine. Vider la bouteille poubelle de nouveau après avoir nettoyé le système quand il n’y a pas d’analyse à lancer le même jour.

Après avoir fini toutes les analyses, nettoyer les analyses dans un bain à ultrasons avec de l'eau Millipore puis 5 min dans du MeOH. Purger les canaux utilisés (C et D) en utilisant la bouteille d'eau pure Millipore pendant 10-30 min. Il est important de supprimer les sels avant de changer de phase mobile.

IV. Protocole d'extraction des ARNs avec le kit RNeasy® Plant mini

- Sortir le nombre d'échantillons à extraire en une demis journée

- Préparer par échantillons : Une colonne lilas, une colonne rose, 2 tubes eppendorf 2 mL, 2 tubes collecteurs 1.5 mL

- Vérifier que le tampon RPE est prêt (ajout d'éthanol)

- Prélever 550 µL de tampon RLT par échantillon et sous la hotte, ajouter 10 µL de β-mercapto-éthanol par mL de tampon RLT.

- Mettre au maximum 100 mg de poudre dans un tube eppendorf 2 mL gardé dans l'azote liquide.

- Disposer tous les échantillons dans un bloc froid, tubes ouverts, pour les garder congelés en manipulant.

- Ajouter dans chaque tube 550 µL du mélange RLT. Vortexer à température ambiante 30sec à 1min après avoir mixer manuellement.

- Centrifuger 2 min à vitesse max (14500 rpm)

- Transférer la totalité du surnageant sur une colonne lilas pour chaque échantillon

- Centrifuger 2 min à vitesse max (14500 rpm)

- Mettre 250 µL d'éthanol dans un nouveau tube eppendorf par échantillon, vider y directement le lysat et jeter la colonne lilas.

- Homogénéiser en pipetant doucement avec une P1000, et transférer au maximum 700 µL sur une colonne rose par échantillon.

- Centrifuger 15 s à 8000 g

- Vider le réservoir

- Ajouter 700 µL de tampon RW1

- Centrifuger 15 s à 8000 g

- Vider le réservoir

- Ajouter 500 µL de tampon RPE

- Centrifuger 15 s à 8000 g

- Vider le réservoir

- Ajouter 500 µL de tampon RPE

- Centrifuger 2 min à 8000 g

- Jeter le tube collecteur et le remplacer par un nouveau

- Centrifuger 1 min à vitesse max (14500 rpm)

- Jeter le tube collecteur et le remplacer par un tube eppendorf 1.5 mL

- Ajouter sur la membrane directement sans la toucher 50 µL d'eau (on peut chauffer l'eau à 65°C au préalable pour améliorer le rendement)

- Centrifuger 1 min à 100 g puis 1 min à 8000 g

- Mettre les tubes dans la glace avant un dosage au Nanodrop. Si besoin, procéder à une seconde élution de 30 µL dans un nouveau tube.

V. Protocole de traitement DNase I Ambion

- Calculer le volume d'extrait nécessaire pour avoir 5 µg d'ARN environ en se basant sur une mesure au nanodrop.

- Compléter avec de l'eau pour avoir un volume final de 44 µL.

- Ajouter 5 µL de DNA buffer

- Ajouter 1 µL de rDNAse I

- Mélanger doucement en retournant le tube

- Incuber pendant 20-30 min à 37°C

Ajouter 5 µL de réactif d'inactivation Dnase

- Incuber 2 min à température ambiante en mélangeant occasionnellement

- Centrifuger 1 min 30 à 10000 g

- Transférer le surnageant dans un nouveau tube.

- Aliquoter sur barette 4 µL pour le dosage au Ribogreen et la vérification à l'expérion.

VI. PROTOCOLE DE VERIFICATION DE LA QUALITE DES ARNS A L'EXPERION

- Préparer le gel marqué en mélangeant 65 µL de gel filtré à 1 µL de marqueur. Attention, vortexer puis ranger tout de suite à l'obscurité.

- Mettre 1.5 µL d'échantillons en barrettes.

- Dénaturer les échantillons en mettant 2 min à 70 °C, puis conserver à 4°C

- Laver l'électrode en mettant 800 µL de solution de lavage dans la puce de lavage et en l'insérant dans la machine pendant 2 min (ensuite vider et ranger la puce de lavage)

- Laver l'électrode 2 fois en mettant 800 µL d'eau dans la puce de rinçage et en l'insérant dans la machine pendant 2 min (ensuite vider et ranger la puce de rinçage)

- Mettre 9 µL de gel marqué dans le trou gs orange d'une nouvelle puce. Attention à ne pas faire de bulle et à ne pas toucher le fond !

- Initialiser la puce dans la machine en choisissant la pression et le temps indiqués en fonction du type de puce.

- Mettre 9 µL de gel marqué dans le trou gs jaune de la puce initialisée. Attention à ne pas faire de bulle et à ne pas toucher le fond !

- Mettre 9 µL de gel NON marqué dans le trou G. Attention à ne pas faire de bulle et à ne pas toucher le fond !

- Mettre 5 µL de loading buffer dans les puits 1 à 12 et le puit L.

- Mettre 1 µL d'échantillon dans les puits 1 à 12.

- Mettre 1 µL de ladder dans le puit L

- Mettre la plaque à vortexer

- Lire la plaque

- A la fin, ne pas oublier de refaire la procédure de nettoyage de l'électrode.

VII. PROTOCOLE DE DOSAGE DES ARNS EN RIBOGREEN

- Préparer le tampon TE : 1 mL de TE20X + 19 mL d'eau

- Préparer la solution Ribogreen en la diluant 200 fois dans du tampon TE

- Préparer la solution mère d'ARN pour la gamme étalon : 1 aliquot de 2 µL à 1 µg/µL + 998 µL de TE (dilution au 500X)

- Si nécessaire, diluer les échantillons pour avoir des concentrations comprises entre 10 et 100 ng/µL

- Sur une plaque, faire 3 réplicas de gamme (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ng/100µL final dans le puit)

- Déposer 50 µL d'échantillon avec 50 µL de solution Ribogreen.

- Mélanger et centrifuger quelques secondes à 2500 g

- Lire la plaque (le Ribogreen est équivalent au réglage Sybrgreen sur la machine)

VIII. PROTOCOLE DE RETROTRANSCRIPTION AVEC LE KIT ISCRIPT ET L'ALIEN

- Effectuer les dilutions des échantillons pour avoir 10 µL à 70 ng/µL

- Dénaturer 5 min à 70°C et conserver dans la glace

- Procéder à la dilution de la solution mère en suivant les étapes suivantes. Mélanger 1 µL d'alien stock avec 59 µL d'eau (Concentration finale $5*10^8$ copies/µL). En prendre 10 µL et y ajouter 90 µL d'eau. Recommencer avec la nouvelle dilution 3 fois pour avoir une concentration finale de $5*10^4$ copies/µL.

- Faire un mix avec 1 µL de RTase, 4 µL de buffer 5X, 3 µL d'eau et 2 µL d'alien dilué.

- Mettre 10 µL de MIX dans chaque échantillon

- Vortexer et centrifuger quelques secondes à 2500 g

- Procéder à une PCR avec les conditions suivantes : 5 min à 25°C, 45 min à 42°C, 5 min à 85°C et maintenir à 8°C.

IX. PROTOCOLE D'INCLUSION EN RESINE POUR OBSERVATIONS AU MET

Matériel nécessaire :

- éprouvettes

- béchers

- barreaux aimantés

- sorbonne

- gants

- pH mètre

- pipettes automatiques

- pipettes pasteur

- capsules d'inclusion et moules

- étuve thermostatée

Produits :

- Na_2HPO_4 anhydrous : Acros Organics réf. : température ambiante

- NaH_2PO_4 2 H_2O Prolabo réf. : 28015.294 température ambiante

- *Glutaraldéhyde 25% EM grade, distillation purified : EMS réf. : 16210 (réfrigérateur et congélateur)

http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/msds/16200.pdf

- *Acétone : Sigma (armoire à solvant)

- *Osmium tetroxide 4% aqueous solution : EMS réf. : 19150 (Réfrigérateur)

http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/msds/19150.pdf

- *Résine Epon Kit Embed-812/DER73 EMS réf. : 14130 température ambiante

<u>Précautions à prendre pour la manipulation et l'utilisation de ses différents produits :</u>

* Ces produits sont dangereux, ils sont nocifs pour les voies respiratoires et sont irritants pour la peau et peuvent causer de graves maladies, (voir les fiches de sécurité des produits).

Toutes les manipulations effectuées ci-dessous, ainsi que l'utilisation des différents produits sont à faire sous sorbonne, le port de la blouse et des gants est obligatoire, ainsi que les lunettes de protection.

Les déchets seront éliminés dans les différents containers correspondants aux produits.

Produits à préparer :

Préparation du tampon phosphate 0.2 M pH 7.2: pour 100 mL

A - NaH_2PO4 ($2H_2O$), 0.2 M 3.12 g/100 mL

B – Na_2HPO_4, 0.2 M 2.84 g/100 mL

Mélanger 28 ml de A et 72 ml de B

Préparation du fixateur :

	Concentration finale	Volume (10 ml)	Volume (50 ml)
Glutaraldéhyde 25%	2,5%	1	5
Tampon phosphate 0.2 M pH 7.2	0.1 M	5	25
Eau distillée		4	20

Faire le mélange des différents produits et mettre dans la glace.

Préparation de la résine EPON

DER 736 8 mL

EMbed 812 2 mL

NMA 8.9 mL

DMP 30 0.28 mL

- Mélanger les différents produits dans l'ordre avec un barreau aimanté, en les ajoutant les uns après les autres. Conserver le mélange à 4°C. Sortir la résine à température ambiante avant de l'utiliser, voir la mettre quelques minutes à l'étuve à 50 °C. Ne pas agiter trop fortement, il faut éviter les bulles.

- Une faible quantité de fixateur est déposée sur la zone à prélever, à l'aide d'une lame de scalpel le matériel est découpé et plongé dans un tube contenant du fixateur à 4°C.

- Temps de la fixation 4 heures à 8 °C, un léger passage sous vide permet une meilleure pénétration du fixateur.

- Lavage dans le tampon phosphate 0.1 M pH 7.2, plusieurs bains de 15 min. ou la nuit à 4°C, puis le lendemain 3 lavages de 5 min.

- Postfixation avec le tetroxide d'osmium à 2% tamponné avec le tampon phosphate 0.1 M pH 7.2 pendant une heure à 4°C.

- Lavage dans le tampon phosphate, 3 fois 5 min, puis dans l'eau distillée.

- Déshydratation dans des bains croissants d'acétone :

  - 10% 15 min.
  - 20% 15 min.
  - 40% 15 min.
  - 60% 15 min.ou la nuit
  - 80% 15 min. ou la nuit
  - 95% 20 min. X 2
  - 100% 20 min. X3

- Imprégnation dans la résine. Si les échantillons restent à la surface, un léger passage sous vide sera nécessaire, les temps sont indicatifs peuvent être diminués ou augmentés suivant les échantillons. Pour les temps longs bien fermer les tubes et mettre à 4°C.

  - 1/3 résine + 2/3 acétone 24 heures
  - ½ résine + ½ acétone une journée
  - ¾ résine + ¼ acétone une journée
  - Résine pure une nuit

- Le lendemain la résine est remplacée par de la résine fraîche, laisser au moins ½ journée puis inclure dans les capsules, ou des moules (éviter les bulles d'air, les retirer si il y en a).

Mettre à polymériser à 60°C dans une étuve pendant 48 heures. Attendre que la résine polymérisée revienne à température ambiante avant de démouler les échantillons.

RÉFÉRENCES

Aasamaa K, Söber A. Responses of stomatal conductance to simultaneous changes in two environmental factors. Tree physiology (2011) 31: 855-864.

Ainsworth EA, Yendrek CR, Sitch S, Collins WJ, Emberson LD. The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. Annual Review of Plant Biology (2012) 63: 637–61.

Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant physiology (2006) 141: 391-396.

Ashmore MR. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. Plant, Cell & Environnement (2005) 28: 949-964.

Assmann SM, Snyder JA, Lee Y-RJ. ABA-deficient (aba1) and ABA-insensitisve (abi1-1, abi 1-2) mutants of Arabidopsis have a wild-type stomatal response to humidity. Plant, Cell & Environment (2000) 23: 387–395.

Avnery S, Mauzerall D.L, Liu J, Horowitz L.W. Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 1. Year 2000 crop production losses and economic damage. Atmospheric environment (2011) 45: 2284-2296.

Bagard M, Le Thiec D, Delacote E, Hazenfratz-Sauder MP, Banvoy J, Gérard J, Dizengremel P, Jolivet Y. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. Physiologia Plantarum (2008) 134: 559–574.

Ball JT, Woodrow IE, Berry JA. A model predicting stomatal conductance and its ontribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. Progress in Photosynthesis Research (ed. I. Biggins), Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands. (1987) 221-224.

Boccalandro HE, Giordano CV, Ploschuk EL, Piccoli PN, Bottini R, Casal JJ. Phototropins but not cryptochromes mediate the blue light-specific promotion of stomatal conductance, while both enhance photosynthesis and transpiration under full sunlight. Plant physiology (2012) 158: 1475-1484.

Bienert GP, Moller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Moller IM, Schjoerring JK, Jahn TP. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. Journal of Biological Chemistry (2007) 282: 1183-1192.

Brunner AM, Busov VB, Strauss SH. Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. Trends in Plant Science (2004) 9: 49-56.

Bunce JA. Effects of humidity on short-term responses of stomatal conductance to an increase in carbon dioxide concentration. Plant, Cell & Environment (1998) 21: 115-120.

Cabané M, Pireaux J-C, Leger E, Weber E, Dizengremel P, Pollet B, Lapierre C. Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. Plant physiology (2004) 134: 586-594.

Cape JN. Surface ozone concentrations and ecosystem health: Past trends and a guide to future projections. Science of the Total Environment (2008) 400: 257-269.

Castagna A, Ranieri A. Detoxification and repair process of ozone injury: From O-3 uptake to gene expression adjustment. Environmental Pollution (2009) 157: 1461-1469.

Cohen D, Bogeat-Triboulot M-B, Vialet-Chabrand S, Merret R, Courty P-E, Moretti S, Bizet F, Guilliot A, Hummel I. Developmental and environmental regulation of aquaporin gene expression across *Populus* species: Divergence or redundancy? PLoS ONE 8: e55506.

Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. Plant, Cell & Environment (2010) 33: 1419-1438.

Danielsson H, Karlsson GP, Karlsson PE, Håkan P. Ozone uptake modelling and flux-response relationships--an assessment of ozone-induced yield loss in spring wheat. Atmospheric Environment (2003) 37: 475-485.

Day ME. Influence of temperature and leaf-to-air vapor pressure deficit on net photosynthesis and stomatal conductance in red spruce (Picea rubens). Tree Physiology (2000) 20: 57-63.

Del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. Plant physiology (2006) 141: 330-335.

Dghim AA, Dumont J, Hasenfratz-Sauder M-P, Dizengremel P, Le Thiec D, Jolivet Y. Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone sensitivity. Physiologia Plantarum (2012) doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01686.x.

Dickmann DI, Kuzovkina J. Poplars and willow of the world, with emphasis on silviculturally important species. In: Isebrands JG, Richardson J Chapter 2 (eds) Poplars and willows in the world: meeting the needs of society and the environment. FAO/IPC, Rome, Italy, (2008) 135p.

Dizengremel P. Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. Plant physiology and biochemistry (2001) 39: 729-742.

Dizengremel P, Le Thiec D, Bagard M, Jolivet Y. Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. Environmental Pollution (2008) 156: 11-15.

Dizengremel P, Le Thiec D, Hasenfratz-Sauder MP, Vaultier MN, Bagard M, Jolivet Y. Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure. Plant Biology (2009) 11: 35-42.

Dumont J, Spicher F, Montpied P, Dizengremel P, Jolivet Y, Le Thiec D. Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO_2 and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* x *Populus nigra* genotypes. Environmental Pollution (2013) 173: 85-96.

Eckenwalder J. E. Systematics and evolution of *Populus*. In biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Part I, Chapter 1. Edité par Stettler R. F., Bradshaw H. D. Jr., Heilman P. E. et Hinckley T. M. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, Canada. (1996) pp. 7-32.

Einig W, Lauxmann U, Hauch B, Hampp R, Landolt W, Maurer S, Matyssek R. Ozone-induced accumulation of carbohydrates changes enzyme activities of carbohydrate metabolism in birch leaves. New Phytologist (1997) 137: 673-680.

European Environment Agency, Spatial assessment of PM10 and ozone concentrations in Europe (2005). EEA Technical report (2009) n°1 .

Fischer RA. Stomatal opening: role of potassium uptake by guard cells. Science (1968) 160: 784-785.

Fiscus EL, Booker FL, Burkey KO. Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. Plant, Cell & Environment (2005) 28: 997-1011.

Foyer CH, Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. (2005) 17: 1866-1875.

Fuhrer J, Skarby L, Ashmore MR. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. Environmental Pollution (1997) 97: 91-106.

Fuhrer J. Ozone risk for crops and pastures in present and future climates. Naturwissenschaften (2009) 96: 173-194.

Galano A, Vargas R, Martinez A. Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxide radical anion. Physical Chemistry Chemical Physics (2010) 12: 193-200.

Galant A, Preuss ML, Cameron JC, Jez JM. Plant glutathione biosynthesis: diversity in biochemical regulation and reaction products. Frontiers in Plant Science (2011) 2 :1-7.

Gerlier D, Plumet S, Herschke F. Dynamique de l'ARNome du virus de la rougeole. Virologie (2007) 11: 231-245.

Gomi K, Ogawa D, Katou S, Kamada H, Nakajima N, Saji H, Soyano T, Sasabe M, Machida Y, Mitsuhara I, *et al.* A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in Tobacco. Plant & Cell Physiology (2005) 46: 1902–1914.

Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Miltros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N *et al.* Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic Acids Research (2012) 40: 1178-1186.

Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochemistry (1980) 106: 207-212.

Grulke NE, Neufeld HS, Davison AW, Roberts M, Chappelka AH. Stomatal behavior of ozone-sensitive and -insensitive coneflowers (*Rudbeckia laciniata var. digitata*) in Great Smoky Mountains National Park. New Phytologist (2007) 173: 100-109.

Häikiö E, Freiwald V, Julkunen-Tiitto R, Beuker E, Holopainen T, Oksanen E. Differences in leaf characteristics between ozone-sensitive and ozone-tolerant hybrid aspen (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*) clones. Tree Physiology (2009) 29: 53-66.

Han R-M, Zhang J-P, Skibsted LH. Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. Molecules (2012) 17: 2140-2160.

Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K. Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO2. Nature Cell Biology (2006) 8: 391-397.

Heath RL. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change? Environmental Pollution (2008) 155: 453-463.

Hopkins WG. Physiologie végétale--Université DB, ed. (2003).

Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordstrom M, Bohmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI. Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO_2-controlled stomatal movements in guard cells. Nature Cell Biology (2010) 12: 87-93; sup pp 81-18.

Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. Genes & Development (2010) 24: 1695-1708.

Hubbard KE, Siegel RS, Valerio G, Brandt B, Schroeder JI. Abscisic acid and CO_2 signalling via calcium sensitivity priming in guard cells, new CDPK mutant phenotypes and a method for improved resolution of stomatal stimulus–response analyses. Annals of Botany (2011) 1-13.

Imai K, Kobori K. Effects of the interaction between ozone and carbon dioxide on gas exchange, ascorbic acid content, and visible leaf symptoms in rice leaves. Photosynthetica (2008) 46: 387-394.

International Co-operative Programme Modelling & Mapping (ICP M&M). Modelling and Mapping Manual of the LRTAP Convention. Chapter III Mapping Critical Levels for Vegetation (2004) 114p.

International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests (ICP Forests). Manual on methods and criteria for harmonized sampling,

assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. Part VIII. Assessment of Ozone Injury. (2010)

IPCC In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds) Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, (2007) 996 pp.

Iriti M, Faoro F. Chemical diversity and defence metabolism: How plants cope with pathogens and ozone pollution. International Journal of Molecular Sciences (2009) 10: 3371-3399.

Ishida H, Makino A, Mae T. Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. Journal of Biological Chemistry (1999) 274: 5222-5226.

Iyer NJ, Tang Y, Mahalingam R. Physiological, biochemical and molecular responses to a combination of drought and ozone in *Medicago truncatula*. Plant, Cell & Environment (2013) 36: 706-720.

Jarvis PG. The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. Philosophical transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences (1976) 273: 593-610.

Journal officiel des Communautés européennes. Directive 2002/3/CE du parlement européen et du conseil relative à l'ozone dans l'air ambiant. (2002) L67: 14-30.

Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. Analytical Biochemistry (1995) 225: 165-167.

Karlsson PE, Pleijel H, Belhaj M, Danielsson H, Dahlin B, Andersson M, Hansson M, Munthe J, Grennfelt P. Economic assessment of the negative impacts of ozone on crop yields and forest production. A case study of the estate Ostads Sateri in southwestern Sweden. Ambio (2005) 34: 32-40.

Karlsson PE, Braun S, Broadmeadow M, Elvira S, Emberson L, Gimeno BS, Le Thiec D, Novak K, Oksanen E, Schaub M, *et al.* Risk assessments for forest trees: The performance of the ozone flux versus the AOT concepts. Environmental Pollution (2007) 146: 608-616.

Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manoharan K, Kim W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. Australian journal of crop science (2011) 5: 709-725.

Kerstiens G, Lendzian K.J. Interactions between ozone and plant cuticles. I. Ozone deposition and permeability. New Phytologist (1989) 112: 13–19.

Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO2, and Ca^{2+} signaling. Annual Review of Plant Biology (2010) 61: 561-591.

Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K. Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. Nature (2001) 414: 656-660.

Kontunen-Soppela S. Riikonen J, Ruhanen H, Brosché M, Somervuo P, Peltonen P, Kangasjärvi J, Auvinen P, Paulin L, Keinänen M, Oksanen E, Vapaavuori E. Differential gene expression in senescing leaves of two silver birch genotypes in response to elevated CO2 and tropospheric ozone. Plant, Cell & Environment (2010) 33: 1016-1028.

Langebartels C, Wohlgemuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. Plant Physiology and Biochemistry (2002) 40: 567–575.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, *et al*. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics (2007) 23: 2947-2948.

Lawson T. Guard cell photosynthesis and stomatal function. New Phytologist (2009) 181: 13-34.

Lawson T, Oxborough K, Morison JI, Baker NR. Responses of photosynthetic electron transport in stomatal guard cells and mesophyll cells in intact leaves to light, CO_2, and humidity. Plant Physiology (2002) 128: 52-62.

Leuning R. Modelling stomatal behaviour and photosynthesis of Eucalyptus grandis. Australian Journal of Plant Physiology (1990) 17: 159-175.

Leuning R. A critical appraisal of a combined stomatal-photosynthesis model for C3 plants. Plant, Cell & Environment (1995) 18: 339-355.

Lindroth RL. Impacts of elevated atmospheric CO2 and O3 on forests: phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. Journal of Chemical Ecology (2010) 36: 2-21.

Linster CL, Clarke SG. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. Trends in Plant Science (2008) 13: 567-573.

Lombardozzi D, Sparks JP, Bonan G, Levis S. Ozone exposure causes a decoupling of conductance and photosynthesis: implications for the Ball-Berry stomatal conductance model. Oecologia (2012) 169: 651-659.

Lu Z, Quiñones MA, Zeiger E. Temperature dependence of guard cell respiration and stomatal conductance co-segregate in an F_2 population of Pima cotton. Australian Journal of Plant Physiology (2000) 27(5): 457-462.

Mao J, Zhang YC, Sang Y, Li QH, Yang HQ. From The Cover: A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2005) 102: 12270-12275.

Marenco A. The troposheric ozone evolution during the XXth century. Lettre du Programme International Géosphère Biosphère-Programme Mondial de Recherches sur le Climat (PIGB-PMRC) (1994) n°1:10.

Marten H, Hyun T, Gomi K, Seo S, Hedrich R, Roelfsema MRG. Silencing of NtMPK4 impairs CO_2-induced stomatal closure, activation of anion channels and cytosolic Ca^{2+} signals in Nicotiana tabacum guard cells. The Plant Journal (2008) 55: 698-708.

Matyssek R, Le Thiec D, Low M, Dizengremel P, Nunn AJ, Haberle KH. Interactions between drought and O_3 stress in forest trees. Plant Biology (Stuttg) (2006) 8: 11-17.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science (2004) 9: 490-498.

Moller IM, Jensen PE, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology (2007) 58: 459-481.

Mott KA. Opinion: Stomatal responses to light and CO2 depend on the mesophyll. Plant, Cell & Environment (2009) 32: 1479-1486.

Musselman RC, Lefohn AS, Massman WJ, Heath RL. A critical review and analysis of the use of exposure- and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. Atmospheric Environment (2006) 40: 1869-1888.

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. Plant Physiology (2008) 147: 1251-1263.

Noctor G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. Plant, Cell & Environment 29: 409-425.

Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH. Glutathione in plants: an integrated overview. Plant, Cell & Environment (2012) 35: 454-484.

Noe SM, Giersch C. A simple dynamic model of photosynthesis in oak leaves: coupling leaf conductance and photosynthetic carbon fixation by a variable intracellular CO_2 pool. Functional Plant Biology (2004) 31: 1196-1204.

Outlaw WH, Manchester J. Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. Plant Physiology (1979) 64: 79-82.

Pandey S, Zhang W, Assmann SM. Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. FEBS (2007) 581: 2325-2336.

Paoletti E. Ozone slows stomatal response to light and leaf wounding in a Mediterranean evergreen broadleaf, *Arbutus unedo*. Environmental Pollution (2005) 134: 439-445.

Paoletti E, Grulke NE. Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. Environmental Pollution (2010) 158: 2664-2671.

Pleijel H, Danielsson H, Vandermeiren K, Blum C, Colls J, Ojanperä K. Stomatal conductance and ozone exposure in relation to potato tuber yield—results from the European CHIP programme European Journal of Agronomy (2002) 17: 303-317.

Renaut J, Bohler S, Hausman JF, Hoffmann L, Sergeant K, Ashan N, Jolivet Y, Dizengremel P. The impact of atmospheric composition on plants: a case study of ozone and poplar. Mass Spectrometry Reviews (2009) 28: 495-516.

Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC, Siedow JN. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. Plant physiology (2006) 141: 357-366.

Rice-Evans CA, Miller J, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science (1997) 2: 152-159.

Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, Gonzalez JA, Hilal M, Prado FE. Soluble sugars - Metabolism, sensing and abiotic stress. Plant Signaling & Behavior (2009) 4: 388-393.

Saleem A, Loponen J, Pihlaja K, Oksanen E. Effects of long-term open-field ozone exposure on leaf phenolics of European silver birch (*Betula pendula* Roth). Journal of Chemical Ecology (2001) 27: 1049-1062.

Saviranta NMM, Julkunen-Tiitto R, Oksanen E, Karjalainen RO. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. Environmental Pollution (2010) 158: 440-446.

Sitch S, Cox PM, Collins WJ, Huntingford C. Indirect radiative forcing of climate change through ozone effects on the land-carbon sink**.** Nature (2007) 448: 791-794.

Stevenson DS, Dentener FJ, Schultz MG, Ellingsen K, Van Noije TPC, Wild O, Zeng G, Amann M, Atherton CS, Bell N, *et al*. Multimodel ensemble simulations of present-day and near-future tropospheric ozone. Journal of Geophysical Research (2006) 111: D08301.

Tausz M, Grulke NE, Wieser G. Defense and avoidance of ozone under global change. Environmental Pollution (2007) 147: 525-531.

Tuzet A, Perrier A, Loubet B, Cellier P. Modelling ozone deposition fluxes: The relative roles of deposition and detoxification processes. *Agricultural and Forest Meteorology* (2011) 151: 480–492.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research (2012) 40: 1-12.

U.S. EPA. Air quality criteria for ozone and related photochemical oxidants (2006 FINAL). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-05/004aF-cF, 2006.

Vahisalu T, Puzõrjova I, Brosché M, Valk E, Lepiku M, Lindgren O, Moldau H, Pechter P, Wang Y-S, Salojärvi J, *et al*. Ozone-triggered rapid stomatal response involves production of reactive oxygen species and is controlled by SLAC1 and OST1. The Plant Journal (2010) 62(3): 442–453.

Valluru R, Van den Ende W. *Myo*-inositol and beyond - Emerging networks under stress. Plant Science (2011) 181: 387-400.

Vingarzan R. A review of surface ozone background levels and trends. Atmospheric Environment (2004) 38: 3431-3442.

Vlachokostas C, Nastis SA, Achillas C, Kalogeropoulos K, Krmiris I, Moussiopoulos N, Chourdakis E, Banias G, Limperi N. Economic damages of ozone air pollution to crops using combined air quality and GIS modelling. Atmospheric Environment (2010) 44: 3352-3361.

Vollenweider P, Ottiger M, Günthardt-Goerg M.S. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. Environmental Pollution (2003) 124: 101-118.

Wang FF, Lian HL, Kang CY, Yang HQ. Phytochrome B is involved in mediating red light-induced stomatal opening in Arabidopsis thaliana. Molecumar Plant (2010) 3: 246-259.

Wang Y, Noguchi K, Terashima I. Distinct light responses of the adaxial and abaxial stomata in intact leaves of Helianthus annuus L. Plant, Cell & Environment (2008) 31: 1307-1316.

Wang Y, Noguchi K, Terashima I. Photosynthesis-dependent and -independent responses of stomata to blue, red and green monochromatic light: differences between the normally oriented and inverted leaves of sunflower. Plant & Cell Physiology (2011) 52: 479-489.

Wellburn, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology (1994) 144: 307–313.

White DA, Beadle C, Sands PJ, Worledge D, Honeysett JL. Quantifying the effect of cumulative water stress on stomatal conductance of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*: a phenomenological approach. Australian Journal of Plant Physiology (1999) 26: 17-27

Wieser G, Matyssek R. Linking ozone uptake and defense towards a mechanistic risk assessment for forest trees. New Phytologist (2007) 174: 7-9.

Wilkinson S, Mills G, Illidge R, Davies W.J. How is ozone pollution reducing our food supply? Journal of Experimental Botany (2011) 63: 527-536.

Wilson RC, Fleming ZL, Monks PS, Clain G, Henne S, Konovalov IB, Szopa S, Menut L. Have primary emission reduction measures reduced ozone across Europe? An analysis of European rural background ozone trends 1996–2005. Atmospheric Chemistry and Physics (2012) 12: 437-454.

Wittig VE, Ainsworth EA, Long SP. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. Plant, Cell & Environment (2007) 30: 1150-1162.

Wittig VE, Ainsworth EA, Naidu SL, Karnosky DF, Long SP. Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. Global Change Biology (2009) 15: 396-424.

Wojtaszek P. Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection. Biochemistry journal (1997) 322: 681-692.

Xie X, Wang Y, Williamson L, Holroyd GH, Tagliavia C, Murchie E, Theobald J, Knight MR, Davies WJ, Ottoline Leyser HM, *et al*. The identification of genes involved in the stomatal response to reduced atmospheric relative humidity. Current Biology (2006) 16: 882–887.

Xue S, Hu H, Ries A, Merilo E, Kollist H, Schroeder JI. Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO(2) signal transduction in guard cell. The Embo Journal (2011) 1-14.

Yip M. Ozone in the atmosphere. Environmental Physics (2000) Lettner VO 437-503

Yong JWH, Wong SC, Farquhar GD. Stomatal responses to changes in vapour pressure difference between leaf and air. Plant, cell & Environment (1997) 20: 1213-1216.

Zeiger E, Talbott LD, Frechilla S, Srivastava A, Zhu JX. The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century. New Phytologist (2002) 153: 415-424.

Rôle de la régulation stomatique et de la capacité de détoxication foliaire dans l'estimation d'un seuil de risque à l'ozone pour la végétation

Résumé :

L'ozone troposphérique est un polluant atmosphérique majeur qui agit comme une phytotoxine. Il pénètre dans les feuilles par les stomates avant d'être dissout dans l'apoplaste en générant des radicaux libres oxygénés (ROS) provoquant ainsi un stress oxydatif. Deux barrières existent pour restreindre les effets de l'ozone : (i) les stomates qui peuvent limiter les flux entrants par contrôle de la conductance stomatique et (ii) le système de détoxication des ROS issus de la dégradation de l'ozone. Nous avons étudié les effets de l'ozone (120 ppb) sur ces deux moyens de défense chez trois génotypes de peuplier euraméricain (*Populus deltoides* x *Populus nigra*) placés en conditions contrôlées dans des chambres phytotroniques. Un effet direct de l'ozone sur la photosynthèse et sur les mouvements stomatiques en réponse à des variations de facteurs environnementaux (ralentissement des phénomènes d'ouverture et de fermeture) a été mis en évidence. Les modèles de calcul de la conductance stomatique, sur lesquels se basent les indicateurs de seuil de risque à l'ozone pour la végétation, doivent donc les prendre en compte. De plus, ces travaux ont mis en évidence le rôle prépondérant des concentrations constitutives en antioxidants dans la tolérance à l'ozone ainsi que la complexité de ces mécanismes de détoxication. La notion de flux effectif d'ozone doit prendre en considération ces deux aspects afin de caractériser au mieux les différences de sensibilité à l'ozone intra et inter spécifique.

Mots clés : Ozone, peuplier, détoxication, conductance stomatique

Role of stomatal regulation and capacity of foliar detoxification in the estimation of ozone critical level for vegetation

Abstract :

Tropospheric ozone is a major air pollutant that acts as a phytotoxin. It enters the leaf through the stomata before being dissolved in the apoplast by generating reactive oxygen species (ROS) causing oxidative stress. Two defenses exist to restrict the effects of ozone: (i) the stomata which can limit ozone uptake by regulating stomatal conductance and (ii) the detoxification processes of ROS generated by ozone.We studied the effects of ozone (120 ppb) on these two mechanisms of defense in three euramerican poplar genotypes (*Populus deltoides* x *Populus nigra*) under controlled conditions in phytotronic chambers. A direct effect of ozone on photosynthesis and stomatal movements in response to changes in environmental factors (by slowing the stomatal opening and closure) has been highlighted. Models of stomatal conductance, on which indicators of critical level of ozone for vegetation are based, must take them into account. In addition, these studies have highlighted the role of constitutive concentrations of antioxidants in tolerance to ozone as well as the complexity of these detoxification mechanisms. The notion of effective ozone flux must consider these two aspects to better characterize the intra-and inter-specific differences in sensitivity to ozone.

Keywords: Ozone, poplar, detoxification, stomatal conductance

Cette thèse cofinancée par l'ANR VULNOZ et la région Lorraine a été effectuée au sein de l'UMR 1137 – Ecologie et Ecophysiologie Forestières. INRA, UMR1137 EEF, F-54280 Champenoux. Université de Lorraine, UMR1137 EEF, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy.